

TESIS DE DOCTORADO

**CONTROL DE LA CONFORMACIÓN DE
LA DIANA Y EL LIGANDO PARA EL
DESARROLLO DE NUEVOS ANTIBIÓTICOS –
APLICACIÓN A LA INHIBICIÓN DEL ENZIMA
SIQUIMATO QUINASA**

Marina Pernas Marín

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2019





DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

Control de la conformación de la diana y el ligando para el desarrollo de nuevos antibióticos – Aplicación a la inhibición del enzima siquimato quinasa

Dña. Marina Pernas Marín

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mi para la obtención de otros títulos.

En Santiago de Compostela., 4 de Septiembre de 2019

Asdo. Marina Pernas Marín





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/A DE LA TESIS

Control de la conformación de la diana y el ligando para el desarrollo de nuevos antibióticos – Aplicación a la inhibición del enzima siquimato quinasa

Dña. Concepción González Bello

INFORMA:

*Que la presente tesis, se corresponde con trabajo realizado por Dña. **Marina Pernas Marín**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directora de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Lei 40/2015.*

En Santiago de Compostela, 4 de Septiembre de 2019

Asdo: Concepción González Bello



ÍNDICE

Abreviaturas

Abstract

Capítulo 1. Introducción	1
1.1 La Resistencia Bacteriana a los Antibióticos – El Reto del Siglo XXI	3
1.2 Impacto Social de los Patógenos <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y <i>Helicobacter pylori</i>	7
1.3 Necesidad de Antibióticos con un Nuevo Mecanismo de Acción. Potencial Terapéutico de los Enzimas de la Ruta del Ácido Siquímico	12
1.4 El Enzima Siquimato Quinasa	18
1.5 Conformación Activa del Ácido Siquímico en el Centro Activo de la SQ	22
1.6 Inhibidores de SQ-Mt – Antecedentes	25
1.7 Estrategias en el Diseño de Inhibidores Basados en la Diana	28
1.8 Cambios Conformationales de la SQ para la Regeneración Catalítica	30
Capítulo 2. Objetivos	35
2.1 Objetivos	37
Capítulo 3. Miméticos Estables de la Conformación de Alta Energía del Sustrato Natural	41
3.1 Planteamiento y Antecedentes	43
3.2 Síntesis de los compuestos 10	47
3.3 Intentos de Síntesis de los Compuestos 11	49
3.4 Intentos de Síntesis de los Compuestos 12	52
3.5 Intentos de Síntesis del Compuesto 13	54
3.6 Evaluación Enzimática de los Compuestos 10	58
3.7 Modo de Unión de los Inhibidores 10	60
Capítulo 4. Inhibidores que Alteran la Conformación Activa de la SQ	65
4.1 Inhibidores que Estabilizan una Conformación Cerrada e Inactiva del Enzima	67
4.1.1. Antecedentes – Planteamiento	67

4.1.2. Síntesis de las <i>N</i> -alquilaminas 14	69
4.1.3. Síntesis del Compuesto 15	71
4.1.4. Síntesis de los Triazoles 16	72
4.1.5. Evaluación Enzimática de los Compuestos 14–16	73
4.2 Inhibidores que Estabilizan una Conformación Abierta e Inactiva del Enzima	74
4.2.1. Precedentes – Planteamiento	74
4.2.2. Síntesis de los Compuestos 17	77
4.3 Estudio del Efecto de un Sustituyente en C4	78
4.3.1. Planteamiento	78
4.3.2. Síntesis de los Compuestos 18	80
4.3.3. Síntesis de los Compuestos 19 y 20	81
Capítulo 5. Sección Experimental	83
5.1 General Procedures: Methods and Equipment	85
5.2 General procedure for synthesis of compounds 22	85
5.2.1. Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-(2-ethylallyloxy)-3,4- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (22b)	86
5.2.2. Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-5-(2-propylallyloxy)-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (22c)	86
5.2.3. Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-5-(2-butylallyloxy)-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (22d)	87
5.2.4. Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-(2-cyclopropylmethylallyloxy)-3,4- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (22e)	88
5.2.5. Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-[(2-(ethoxymethyl)allyloxy)-3,4- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (22f)	89
5.2.6. Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-[(2-(benzyloxymethyl)allyloxy)-3,4- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (22g)	90
5.2.7. Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-[(2-((<i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)methyl)allyloxy)-3,4- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (22i)	90
5.3 General procedure for ring-closing metathesis of compounds 40a–g and i ...	91

5.3.1. Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-ethyl-6,10- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (40b)	92
5.3.2. Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-6,10- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-4-propyl-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (40c).....	92
5.3.3. Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-butyl-6,10- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (40d)	93
5.3.4. Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-cyclopropylmethyl-6,10- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (40e)	94
5.3.5. Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-(ethoxymethyl)-6,10- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (40f)	94
5.3.5.1 Preparation of 40f from 40i	95
5.3.6. Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-(benzyloxymethyl)-6,10- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (40g)	96
5.3.6.1 Preparation of 40g from 40i	96
5.3.7. Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-((<i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)methyl)-6,10- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (40i)	97
5.4 Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-(hydroxymethyl)-6,10- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (40h)	97
5.5 General procedure for the acetal deprotection in 40a–h	98
5.5.1 Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-ethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (41b)	98
5.5.2 Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-6,10-dihydroxy-4-propyl-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (41c).....	99
5.5.3 Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-butyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (41d)	99
5.5.4 Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-cyclopropylmethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (41e)	100
5.5.5 Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-ethoxymethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (41f)	101

5.5.6	Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-benzyloxymethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (41g)	101
5.5.7	Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-hydroxymethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylate (41h).....	102
5.6	General procedure for the ester hydrolysis in 41a–h	102
5.6.1	(1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-ethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylic acid (10b)	103
5.6.2	(1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-6,10-dihydroxy-4-propyl-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylic acid (10c).....	103
5.6.3	(1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-butyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylic acid (10d)	104
5.6.4	(1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-cyclopropylmethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylic acid (10e)	104
5.6.5	(1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-ethoxymethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylic acid (10f).....	105
5.6.6	(1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-benzyloxymethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylic acid (10g)	105
5.6.7	(1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-4-hydroxymethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(<i>Z</i>),7-diene-8-carboxylic acid (10h).....	106
5.7	Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxy-5-oxo-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (44).....	106
5.8	Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-allyl-5-hydroxy-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxy-3-vinylcyclohex-1-eno-1-carboxylate (42S) and methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-allyl-5-hydroxy-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxy-3-vinylcyclohex-1-eno-1-carboxylate (42R).....	107
5.9	Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-[(<i>R/S</i>)-but-3-en-2-yl]-5-hydroxy-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (43).....	108
5.10	Methyl (1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-1-hydroxy-5,9- <i>O</i> -isopropylidendioxybicyclo[3.2.1]nona-3,6-diene-7-carboxylate (45).....	109
5.11	Ring-closing metathesis of 42R (46)	110
5.12	Methyl (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i>)-7-(4-(benzyloxy)but-1-yn-1-yl)-7-hydroxy-3,4-dimethoxy-3,4-dimethyl-2,5-dioxabicyclo[4.4.0]dec-8-ene-9-carboxylate (55 <i>S</i>) and Methyl (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-7-(4-(benzyloxy)but-1-yn-1-yl)-7-	

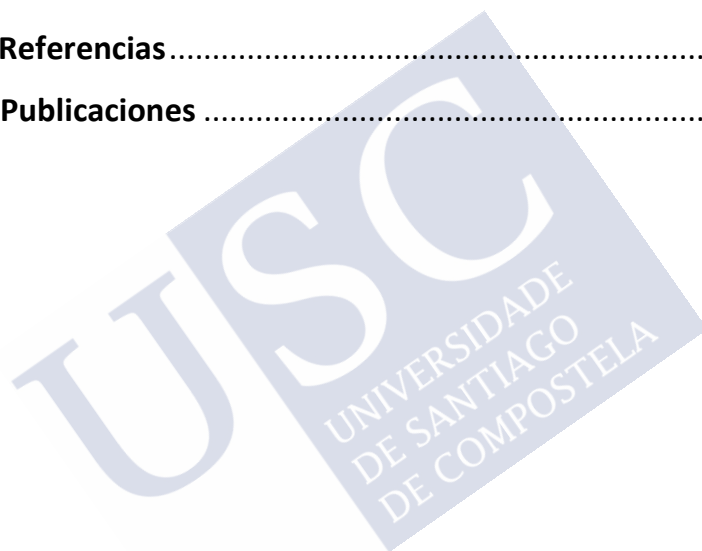
hydroxy-3,4-dimethoxy-3,4-dimethyl-2,5-dioxabicyclo[4.4.0]dec-8-ene-9-carboxylate (55R).....	110
5.13 Methyl (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3-(4-(benzoyloxy)but-1-yn-1-yl)-3,4,5-trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (56) ...	112
5.14 Methyl (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-3-(4-(benzoyloxy)but-1-yn-1-yl)-5-hydroxy-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (52)	112
5.15 Methyl (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-3-(4-(benzoyloxy)but-1-en-1-yl)-5-hydroxy-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (57)	113
5.16 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-5-hydroxyimino-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (60)	114
5.17 Methyl (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5-amino-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (61)	115
5.18 Methyl (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3-ethynyl-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxy-5-(methylsulfonyloxy)cyclohex-1-ene-1-carboxylate (67b)	115
5.19 Methyl (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3-ethynyl-3,4-dihydroxy-5-(methylsulfonyloxy)cyclohex-1-ene-1-carboxylate (68)	116
5.20 Epoxide (58)	117
5.21 Methyl (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-azido-3-ethynyl-3,4-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (69)	117
5.22 Methyl (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-azido-3-ethynyl-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (70)	118
5.23 Methyl (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-amino-3-ethynyl-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (71)	119
5.24 Methyl (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-amino-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (59)	119
5.25 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-(3-butenamido)-3,4- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (72)	120
5.26 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-(3-butenoyloxy)-3,4- <i>O</i> -isopropylidenedioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (75)	121
5.27 Ring-closing metathesis of 23 (76)	122
5.28 General procedure for reductive amination	122

5.28.1 Methyl (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i>)-3,4-dimethyl-3,4-dimethoxy-2,5-dioxo-7-[<i>N</i> -(<i>thien-2-yl</i>)methyl]aminobicyclo[4.4.0]dec-8-en-9-carboxylate (82a)	123
5.28.2 Methyl (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i>)-3,4-dimethyl-3,4-dimethoxy-2,5-dioxo-7-[<i>N</i> -(<i>furan-2-yl</i>)methyl]aminobicyclo[4.4.0]dec-8-en-9-carboxylate (82b)	123
5.28.3 Methyl (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i>)-7-[<i>N</i> -(<i>benzofuran-2-yl</i>)methyl]amino-3,4-dimethyl-3,4-dimethoxy-2,5-dioxabicyclo[4.4.0]dec-8-en-9-carboxylate (82f)	124
5.28.4 Methyl (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i>)-3,4-dimethyl-3,4-dimethoxy-2,5-dioxo-7-[<i>N</i> -3-(<i>furan-2-yl</i>)propyl]aminobicyclo[4.4.0]dec-8-en-9-carboxylate (86)	125
5.28.5 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-3-[(<i>pyrrol-2-yl</i>)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (83c)	126
5.28.6 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-3-[<i>N</i> -(1 <i>H</i> - <i>indol-2-yl</i>)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (83d)	126
5.28.7 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-3-[<i>N</i> -(1 <i>H</i> - <i>indol-3-yl</i>)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (83e).....	127
5.28.8 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-3-[<i>N</i> -(<i>benzofuran-2-yl</i>)methyl]amino-4,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (83f)	128
5.28.9 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-3-[(<i>furan-2-yl</i>)propyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (87)	128
5.29 General procedure for bisacetal deprotection	129
5.29.1 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-3-[<i>N</i> -(<i>thien-2-yl</i>)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (83a).....	129
5.29.2 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-3-[<i>N</i> -(<i>furan-2-yl</i>)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (83b)	130
5.30 (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-3-[<i>N</i> -(<i>thien-2-yl</i>)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylic acid (14a)	130
5.31 (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-3-[<i>N</i> -(<i>furan-2-yl</i>)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylic acid (14b)	131
5.32 General procedure for the synthesis of carboxylic acids as sodium salts	131

5.32.1 Sodium (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-3-[<i>N</i> -(pirrol-2-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (14c)	132
5.32.2 Sodium (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-3-[<i>N</i> -(1 <i>H</i> -indol-2-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (14d)	132
5.32.3 Sodium (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-3-[<i>N</i> -(1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (14e)	133
5.32.4 Sodium (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-3-[(benzofuran-2-yl)methyl]amino-4,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (14f)	133
5.32.5 Sodium (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-3-[3-(furan-2-yl)propyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (15)	134
5.33 Methyl (1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>S</i>)-3,4-dimethyl-3,4-dimethoxy-2,5-dioxo-7-(2-propinyl)bicycle[4.4.0]dec-8-en-9-carboxylate (89)	134
5.34 General procedure for 1,3-dipolar cycloaddition reaction	135
5.34.1 Methyl (1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>S</i>)-3,4-dimethyl-7-[(1-(4-methoxybenzyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)]methoxy-3,4-dimethoxy-2,5-dioxabicycle[4.4.0]dec-8-en-9-carboxylate (90a)	136
5.34.2 Methyl (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i>)-3,4-dimethoxy-7-[(1-(4-methoxybenzyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methoxy]-3,4-dimethyl-2,5-dioxabicycle[4.4.0]dec-8-en-9-carboxylate (90b)	136
5.35 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3-(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methoxy-4,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (91a)	137
5.36 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methoxy-4,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (91b)	138
5.37 Sodium (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3-(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methoxy-4,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (16a)	139
5.38 Sodium (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3-[1-(4-methoxybenzyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl]methoxy-4,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (16b)	139
5.39 Ethyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-azido-3,4-(<i>O</i> -isopropyliden)cyclohex-1-ene-1-carboxylate (95)	140
5.40 Ethyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-amino-3,4-(<i>O</i> -isopropyliden)cyclohex-1-ene-1-carboxylate (96)	141
5.41 Ethyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-(<i>N</i> -(naphth-2-yl)methyl)amino-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (97a)	141

5.42 Ethyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-[<i>N</i> -(6-methylnaphth-2-yl)methyl]amino-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxy-1-cyclohex-1-ene-1-carboxylate (97b)	142
5.43 Ethyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-[<i>N</i> -(benzothiophen-2-yl)methyl]amino-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxy-1-cyclohex-1-ene-1-carboxylate (97c).....	143
5.44 Ethyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-[<i>N,N</i> -ethyl(naphth-2-ylmethyl)]amino-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxy-1-cyclohex-1-ene-1-carboxylate (98a)	143
5.45 Ethyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-[<i>N,N</i> -ethyl(6-methylnaphth-2-yl)methyl]amino-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxy-1-cyclohex-1-ene-1-carboxylate (98b)	144
5.46 Ethyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-[<i>N,N</i> -(benzothiophen-2-ylmethyl)ethyl]amino-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxy-1-cyclohex-1-ene-1-carboxylate (98c).....	145
5.47 Ethyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4-dihydroxy-5-[<i>N,N</i> -ethyl(naft-2-ylmethyl)]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (99a)	146
5.48 Ethyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4-dihydroxy-5-[<i>N,N</i> -ethyl(6-methylnaft-2-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (99b)	146
5.49 Ethyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4-dihydroxy-5-[<i>N,N</i> -ethyl(benzotiofen-2-ylmethyl)]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (99c).....	147
5.50 General procedure for ester hydrolysis in compounds 99	148
5.50.1 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4-dihydroxy-5-[<i>N,N</i> -ethyl(naft-2-ylmethyl)]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylic acid ammonium salt (17a)	148
5.50.2 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4-dihydroxy-5-[<i>N,N</i> -ethyl(6-methylnaft-2-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylic acid ammonium salt (17b)	149
5.51 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,5-bis(<i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)-4-hydroxy-4-methylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (102)	149
5.52 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-4-methylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (103)	150
5.53 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4,5-Trihydroxy-4-methylcyclohex-1-ene-1-carboxylic acid (18)	151
5.54 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-hydroxy-3,4- <i>O</i> -isopropylidendioxy-4-methylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (104).....	151
5.55 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benzyloxy-3,5-di(<i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)cyclohex-1-ene-1-carboxylate (105).....	152

5.56 Methyl (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benzyloxy-3,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (106)	153
5.57 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4-benzyloxy-3,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylic (19) .	153
5.58 Methyl (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-6-benzyloxy-10-hydroxy-4-methyl-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4,7-diene-8-carboxylate (107).....	154
5.59 (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-6-benzyloxy-10-hydroxy-4-methyl-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4,7-diene-8-carboxylic acid (20)	155
Capítulo 6. Conclusiones	157
ANEXO I. Espectros de RMN	161
ANEXO II. Listado de Estructuras	263
ANEXO III. Referencias	275
ANEXO IV. Publicaciones	283







Abreviaturas



Å	Angstrom
ac.	Acuoso
Ac	Acetilo
Ác.	Ácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
Ala	Alanina
anh.	Anhidro
Aprox.	Aproximadamente
Ar	Aromático
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosín trifosfato
Bn	Bencilo
br	ancho
ax	Axial
c	cuartete, concentrado
cat	Catalítico
CESGA	Centro de Supercomputación de Galicia
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
°C	Grados centígrados
cm	Centímetros
¹³ C-RMN	Resonancia Magnética nuclear de carbono
CSA	Ácido comforsulfónico
d	Doblete
δ	Desplazamiento químico expresado en ppm relativo al TMS
Δ	Reflujo
DAHP	3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato
DCM	Diclorometano
dd	Doble doblete
ddd	Doble doblete doblete
DEPT	Incremento no distorsionado por transferencia de polarización
DM	Dinámica Molecular
DMAP	<i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
dppb	1,4-Bis(diphenylphosphino)butane
ec	Ecuatorial
ECDC	Centro Europeo para la prevención de enfermedades
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ESI	Electrospray

EPSP	5-enolpiruvilsiquimato 3-fosfato
Et	Etilo
Et ₃ N	Trietilamina
g	Gramos
Glu	Glutámico
Gly	Glicina
h	Hora(s)
<i>H.</i>	<i>Helicobacter</i>
His	Histidina
HMRS	Espectrometría de masas de alta resolución
¹ H-NMR	Resonancia magnética nuclear de protón
<i>Hp</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Hz	Herzios
Ile	Isoleucina
<i>i</i> PrOH	isopropanol
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento expresada en Hz
<i>K_i</i>	Constante de inhibición
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis
LDH	Lactato Deshidrogenasa
Leu	Leucina
Lys	Lisina
m	Multiplete
M	Molar
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
Me	Metilo
Met	Metionina
mg	Miligramos
MH ⁺	Ión molecular
MHz	Megahercios
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mmol	Milimoles
mp	Punto de fusión
MS	Espectrometría de masas
ms	Milisegundo
Ms	Mesilo
<i>Mt</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
μM	Micromolar
m/z	Relación masa/carga
NAD ⁺	Nicotiamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotiamida adenina dinucleótido (forma reducida)

NADP ⁺	Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
nM	Nanomolar
NOE	Espectroscopía nuclear Overhauser
NOE	Espectroscopía nuclear de Efecto Overhauser
ns	Nanosegundo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PEP	fosfoenolpiruvato
PDB	Banco de datos de proteínas
Ph	Fenilo
Phe	Fenilalanina
Pi	Piridina
PPh ₃	trifenilfosfina
ppm	Partes por millón
Pro	Prolina
PQ	Piruvato Quinasa
Ps	picosegundo
q	cuartete
quint	quintuplete
RCM	Metátesis de cierre de anillo “Ring-Closing Methatesis”
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singulete
sat.	Saturado
Ser	Serina
SQ	Siquimato Quinasa
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TB	Tuberculosis
TBAF	Fluoruro de tetrabutylamonio
TBAI	Ioduro de tetrabutylamonio
TBS	<i>Terc</i> -butildimetilsililo
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
Val	Valina
WAT	Agua
XDRTB	Cepa de tuberculosis extremadamente resistente





Abstract



The discovery and subsequent development of antibiotics in the last century is probably one of the most relevant achievements in medicine. These drugs have saved millions of lives that in the past were fatal, and have become crucial for the successful recovery of hospitalized patients undergoing general surgery, cancer chemotherapy, dialysis, etc., for which the treatment of secondary infections is essential. However, nowadays, the increasing emergence and spread worldwide of superbugs, which are multi-resistant bacteria, has made infectious diseases one of the most important public health issues. Antibiotic resistance levels are so high that, unless actions are taken, WHO have estimated that by 2050 this issue could kill 10 million people per year, which are more than currently die from cancer. In particular, there is a huge concern about the increasing emergence of resistant pathogens that are common in clinical settings, such as *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*. The latter bacteria in addition to the difficult to treat *Mycobacterium tuberculosis*, which is a top global health priority since many years, have been classified by WHO as critical pathogens on which R&D resources should be prioritized. *M. tuberculosis* causes tuberculosis, an infection disease that kills about 1.8 million people every year. The main issue of this bacterium, in addition to its virulence, is the quite inefficient and long-term treatment (between 6-24 months) with four drugs available clinically. Another relevant pathogen is *Helicobacter pylori*, which is a Gram-negative bacteria responsible of the chronic gastritis and duodenal ulcers and also it has been considered as type I carcinogen by the WHO.

Four main factors are responsible for the actual levels of bacterial resistance to antibiotics: (i) the inherent ability of bacteria to survive in hostile environments; (ii) the inappropriate and excessive use of the antimicrobials in medicine, veterinary and agriculture; (iii) the lack of investment in R&D by the pharmaceutical industry in the last decades, due to the limited economic profit of a short-term treatment of this type compared with the huge economic costs of bringing a drug to the market;

and (iv) the lack of innovative strategies for the development of novel antibiotics. Thus, most of the novel antibiotics under clinical studies are modifications of previous ones and deal with the same type of biological targets for which bacteria has already developed very efficient resistant mechanisms. Therefore, if we do not want to return to the pre-antibiotic era it is necessary to develop alternative therapies with new mechanisms of action.

In our research group we are exploring the therapeutic potential of some of the enzymes involved in the shikimic acid pathway, because most of them are essential for *M. tuberculosis* and *H. pylori* growth but they are absent in mammals. The main aim of this PhD thesis is the development of new antibiotics based on the effective and selective inhibition of **shikimate kinase** (SK), which is the fifth enzyme of the shikimic acid pathway. By the latter pathway, bacteria as well as fungi and plants biosynthesize chorismic acid, which is the synthetic precursor of the essential aromatic amino acids and other relevant aromatic compounds, such as folate cofactors, ubiquinone, and vitamins E and K. The SK enzyme is essential for *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, and *Pseudomonas aeruginosa*, among others. SK catalyzes the stereospecific phosphorylation of shikimic acid by using ATP as a cofactor to afford shikimate-3-phosphate. SK is a magnesium-dependent enzyme that has two recognition centres, one for shikimic acid and another for the cofactor. Moreover, this enzyme contains three domains: (i) the LID domain, that closes over the active site for catalysis and contains an essential arginine residue; (ii) the P-loop, which is crucial in the ATP/ADP recognition; and (iii) the shikimic acid binding (SB) domain that isolates the substrate from the water environment for catalysis.

To achieve the inhibition of the SK enzymes from *M. tuberculosis* and from *H. pylori*, in this PhD thesis we have made use of two appealing concepts in drug design, the control of the ligand and/or target conformations. Thus, flexible ligands upon binding to their biological target may suffer an entropic penalty due to the freezing

of their rotatable bonds to achieve the active binding conformation. In some cases, these ligands may also adopt high-energy active conformations in order to maximize favorable interactions with the residues involved in the protein binding pocket. Hence, pre-organization of the ligand conformation or stabilization of the required high-energy active arrangements through the introduction of conformational constraints is a very attractive strategy used in drug design. The rigidification of the ligand conformation can also be considered as an 'atom-efficient approach', since it maximizes the efficiency of the functional groups introduced into the initial scaffold during the drug optimization process as the interactions of those groups with the binding pocket are well pre-oriented.

To this end, in the first part of this PhD thesis diverse rigidified shikimic acids derivatives, which are stable mimetics of the high-energy conformation of shikimic acid, have been synthesized to enhance the efficacy of our previously reported inhibitor **21** against both SK enzymes (Chapter 3). This compound proved to have an inhibition constant (K_i) of 62 μM against the *M. tuberculosis* enzyme (*Mt*-SK), which is lower than the enzyme K_m (544 μM). The crystal structure of *Mt*-SK in complex with ADP and **21** (PDB entry 4BQS, 2.15 Å) revealed that the rigidification of the diaxial conformation of the C4 and C5 hydroxyl groups in the shikimic acid by a C3–C5 ether bridge causes a dramatic reduction in the flexibility of the LID and SB domains, the plasticity of which is essential for catalytic turnover. The enhancement of the inhibitor efficiency of the scaffold **21** was explored with compounds **10**, which incorporate diverse apolar groups in one of the sp^2 carbon atoms of the unsaturated bridge in **21**. The synthesis of the reported conformationally restricted shikimic acid derivatives was carried out by ring-closing metathesis of allyloxy vinyl derivatives as the key step. The enzymatic evaluation of compounds **10** revealed that they are reversible competitive inhibitors for both enzymes. In general, compounds **10** show: (i) better inhibition properties for the *H. pylori* enzyme (*Hp*-SK) than for the *Mt*-SK; (ii) for *Hp*-SK, the inhibition potency of the ligands increased

with the length of the substituent chain while for *Mt*-SK only the introduction of a methyl group in the rigid ether bridge improved the inhibitory activity; and (iii) the presence of a hydroxyl or an ether group in the substituent only enhanced the inhibitory activity for *Hp*-SK. The most potent inhibitor of the series was compound **10f**, which has a CH₂OEt group, with a K_i value of 5.0 μ M against *Hp*-SK that represents a 20-fold improvement relative to the parent compound **21** (K_i = 104 μ M for *Hp*-SK). Compound **10a**, which has a methyl group, was the best inhibitor for *Mt*-SK showing to have a K_i value of 28 μ M, which represents a 2-fold improvement of the inhibition potency of the parent compound **21** (K_i = 62 μ M).

Computational studies carried out in the research group with the most active ligands, compounds **10a**, **10c**, **10d**, and **10f**, revealed that the ligands would be stable in the shikimic acid active site by the same interactions as the compound **21**, and consequently, in a similar way to the shikimic acid. These studies also showed that the differences in affinity found with the two homologous enzymes are due to the distinct induced-fit conformation adopted by the two enzymes upon ligand binding, which mainly involves the LID domain. For *Hp*-SK, the substituents would be embedded in the active site, with both the lid and the SB domain completely surrounding the entire ligand. As a result, the active site would be neatly closed because the ligands cause a dramatic reduction in the flexibility of the LID and SB domain through a series of favorable apolar interactions between the substituent and the residues in this pocket. In contrast, for *Mt*-SK, as the length of the substituent increases this moiety of the ligand would be pointing away from the active site and therefore they would not contribute to an improvement in ligand affinity. These studies were reported in the article "*Synthesis of Rigidified Shikimic Acid Derivatives by Ring-Closing Metathesis for Imprinting Inhibitor Efficacy against Shikimate Kinase Enzyme*". Pernas, M.; Blanco, B.; Lence, E.; Thompson, P.; Hawkins, A.; González-Bello, C. *Org. Chem. Front.* **2019**, 6, 2514–2528."

In addition, the rigidification of the natural substrate by other types of linkages between the C3 and C5 positions was also explored with compounds **11–13**, which have ether and amine groups (Chapter 3.3–3.5). This type of connection was studied to incorporate extra functional groups in the scaffold able to promote additional apolar interactions with the conserved residues located in the SB domain of the enzyme. Unfortunately, due to many issues found in the synthetic approaches studied and the lack of time, the synthesis of a very advanced synthetic intermediate was only achieved. The future functionalization of the tertiary hydroxyl group of the latter compound, as well as its deprotection would allow us to validate this hypothesis.

On the other hand, the second strategy for the inhibition of the SK enzyme explored in this PhD thesis deals with blocking the target plasticity (Chapter 4). It is well-known that enzymes are flexible and dynamic macromolecules that change their conformation upon ligand binding to maximize their interactions with them. In other words, enzymes use the namely ‘induced-fit model’ through which are able to adopt diverse conformations during catalysis and that it is the basis of the catalytic turnover. Therefore, freezing enzyme flexibility is also an interesting approach for achieving the inhibition of the target since their plasticity is also essential for catalysis. By using this less exploited ‘motion-based design approach’, in this PhD thesis we have also explored the inhibition of the SK enzyme by ligands able to block the closure of the active site by reducing the flexibility of the LID and SB domains. This alternative strategy would allow the design of ligands that target additional cavities generated during the motion that would be hidden if the intrinsic plasticity of the target is not taken into account.

To this purpose, Chapter 4 is focused on the inhibition of SK by stabilization of inactive conformations and/or reduction of the intrinsic SK flexibility. This idea was attempted in three different ways. Firstly, based on our previously reported results obtained with (*R*)-3-amino- (**77**) and (*S*)-3-aminoshikimic acids (**78**) that proved to

be reversible competitive inhibitors of *Mt*-SK with K_i values of 62 and 65 μM , respectively, the possible enhancement of the inhibition potency of compound **77** and **78** was attempted. This hypothesis was explored by the introduction of extra functional groups in the amino moiety in **77** able to promote extra binding interactions with the interface between the shikimic acid and ATP binding sites. To this end, compounds **14–16**, which contain diverse aromatic rings, were synthesized by a reductive amination reaction as key step. The results obtained with the synthesized compounds revealed that the introduction of the type of alkylaryl moieties studied provides less potent reversible competitive inhibitors than the parent compound **77**.

The second approach studied in Chapter 4 involved the design of ligands able to stabilize an open and inactive conformation of the SK. This idea was explored with ligands **17**, which are mimetics of the natural substrate that have a tertiary amino group in position C5. The design of compounds **17** was based on our previously reported results with compounds **92b** and **93a**, which are shikimic acid derivatives having (benzo[*b*]thiophen-5-yl)methoxy and di(naphth-2-yl)methylamino groups in position C5, respectively. 5-benzothiophenyl derivative **92b** proved to be a nanomolar reversible competitive inhibitor of *Hp*-SK ($K_i = 560 \text{ nM}$) and an ester prodrug of **92b** gave excellent *in vitro* activity against *H. pylori*, having a MIC value of 4 $\mu\text{g/mL}$. Moreover, compound **93a** showed to be very efficient against *Hp*-SK with a $K_i = 300 \text{ nM}$, which is the best inhibitor reported so far. In this thesis, we want to explore the effect on the enzymatic activity of the replacement of one of the alkylaryl chains in **93a** by simple alkyl chains to explore the necessity of the two chains for activity. The compounds were synthesized by a tandem reductive amination approach. The results from the enzymatic activity studies revealed that both alkylaryl chains in compounds **93** are required to achieve the effective inhibition of the *Hp*-SK enzyme.

Finally, the third approach explored was based on the differences observed in the intrinsic motion of the two homologous enzymes studied. Thus, Molecular Dynamic simulation studies carried out with the enzyme-products complexes showed that the active site of *Mt*-SK opens like an accordion for product release involving the large opening of both LID and SB domains. On the contrary, while a large opening of the LID domain of the *Hp*-SK enzyme was also identified, the SB domain only seems to undergo a small twist. This finding explained the better inhibition results always obtained against *Hp*-SK vs the *Mt*-SK with compounds **92** and **93**. Thus, Computational studies reveal that, in all cases, these benzyl groups are properly submerged in the SB domain because the motion (twist), and the arrangement achieved by the benzyl group are tuned. However, for *Mt*-SK, it seems that it is still much space available to properly wrap the ligand. To explore if the functionalization of the C4 position of the natural substrate would allow the ligand to more adequately occupy the dynamic gap available in the *M. tuberculosis* enzyme compounds **18-20** were synthesized. The enzymatic results revealed that these modifications do not enhance the previous inhibition potency.





Capítulo 1. Introducción



1.1 La Resistencia Bacteriana a los Antibióticos – El Reto del Siglo XXI

El descubrimiento de la penicilina durante la primera mitad del siglo 20, junto con los antibióticos desarrollados posteriormente, sin duda, es uno de los mayores logros de la medicina.^{1,2} Estos fármacos, no solamente han salvado millones de vidas mediante la cura de enfermedades infecciosas que en el pasado eran letales,³ sino además se han consolidado como una herramienta clave en el éxito de procedimientos hospitalarios comunes, subsanando las complicaciones infecciosas habituales en pacientes vulnerables que se encuentran, entre otros, en tratamiento de quimioterapia contra el cáncer, en diálisis por fallos renales, en transplante de órganos y cirugía general. Sin embargo, la capacidad de estos fármacos para curar las enfermedades infecciosas está en riesgo debido a la emergente aparición de cepas multirresistentes a los antibióticos.^{4,5,6}

Los principales factores causantes de los alarmantes niveles actuales de resistencia bacteriana son:

- i) la habilidad innata de las bacterias para el desarrollo de mecanismos muy eficientes que evitan la acción de los antibióticos.^{7,8}
- ii) el uso abusivo e inapropiado de los antibióticos, incluso para el tratamiento de enfermedades no infecciosas, tanto en humanos como en agricultura y ganadería.^{8,9}
- iii) la falta de inversión en I+D de la industria farmacéutica después de los años 60,¹⁰ debido al limitado beneficio económico obtenido por este tipo

¹ Aminov, R. I. *Front. Microbiol.* **2010**, *1*, 1–7.

² Fleming, A. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226–236.

³ Sengupta, S.; Chattopadhyay, M. K.; Grossart, H. P. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 1–13.

⁴ Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A.K.M.; Wertheim, H.F.L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G.L.; Gould, I.M.; Goossens, H. et al. *Lancet Infect Dis.* **2013**, *13*, 1057–1098.

⁵ Palumbi, S. R. *Science.* **2001**, *293*, 1786–1790.

⁶ Coates, A.; Hu, Y.; Bax, R.; Page, C. *Nat. Rev. Drug. Discovery.* **2002**, *1*, 895–910.

⁷ D’Costa, V. M.; King, C. E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W. W. L.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels, F.; Debruyne, R.; Golding, G. B.; Poinar, H. N.; Wright, G. D. *Nature.* **2011**, *477*, 457–461.

⁸ http://www.who.int/drugresistance/Microbes_and_Antimicrobials/es/index/html

⁹ Ventola, C. L. *P & T: a peer-reviewed J. Formul. Manag.* **2015**, *40*, 277–283.

¹⁰ Chopra, I.; Hesse, L.; O’Neill, A. *Pharmacochemistry Library.* **2002**, *32*, 213–225.

de tratamientos de corta duración, en comparación con el costoso esfuerzo requerido para la comercialización de un nuevo fármaco. Además, muchas de las enfermedades infecciosas más mortales tienen mayor incidencia en países en desarrollo con escasos recursos, por lo que los fármacos a desarrollar tienen que ser baratos.

- iv) la carencia de estrategias innovadoras para el desarrollo de antibióticos con mecanismos de acción alternativos. Actualmente, las dianas terapéuticas sobre las que inciden los antibióticos en uso clínico son principalmente cinco: la biosíntesis de la pared celular, la síntesis de las proteínas, la replicación y reparación del ADN, el metabolismo del ácido fólico y la estructura de la membrana celular. Prácticamente todos los antibióticos comercializados en los últimos 30 años son modificaciones de otros desarrollados con anterioridad.^{11,12,13} Solamente dos de estos fármacos presentan un nuevo mecanismo de acción: Brilacidin (PMX-30063, fase 2, Cellceutix Corp.), que es un mimético sintético de la proteína de defensa del huésped, la cual actúa en primera línea de defensa ante una infección bacteriana en muchas especies; y ACHN-97 (fase 1, Achaogen Inc.), un inhibidor del enzima LpxC implicado en la biosíntesis del Lípido A.¹⁴

La resistencia a los antibióticos no solo tiene relevancia desde el punto de vista social, sino también desde el punto de vista económico debido a los gastos adicionales que conlleva. Según un informe realizado por el Centro Europeo para la Prevención de Enfermedades (ECDC) y la Agencia Europea de Medicamento (EMA)¹⁵ de la Comunidad Europea calcula que cada año 25.000 europeos mueren como consecuencia directa de las infecciones producidas por cepas

¹¹ Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. *Science*. **2009**, 325, 1089–1093.

¹² Lewis, K. *Nature*. **2012**, 485, 439–440.

¹³ Moyer, M. W. *Sci. Am.* **2016**, 315, 70–79.

¹⁴ González-Bello, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 4221–4228.

¹⁵ <http://www.ecdc.europa.eu>

multirresistentes. Se estima que el impacto económico causado por este tipo de infecciones, principalmente debido a los costes adicionales de la hospitalización, es de 1.5 billones de euros al año. Si no se pone freno a este problema, la Organización Mundial de la Salud (OMS) prevee que la tasa de mortalidad debido a infecciones fármaco resistentes siga aumentando, alcanzando la decena de millones de muertes al año en el 2050, convirtiendo así a las enfermedades infecciosas, en uno de los problemas más importantes de salud pública del siglo XXI (Figura 1).¹⁶ Por lo tanto, para hacer frente a este creciente problema, es necesario descubrir y desarrollar nuevos antibióticos con un mecanismo de acción alternativo a los desarrollados hasta la fecha.¹⁷

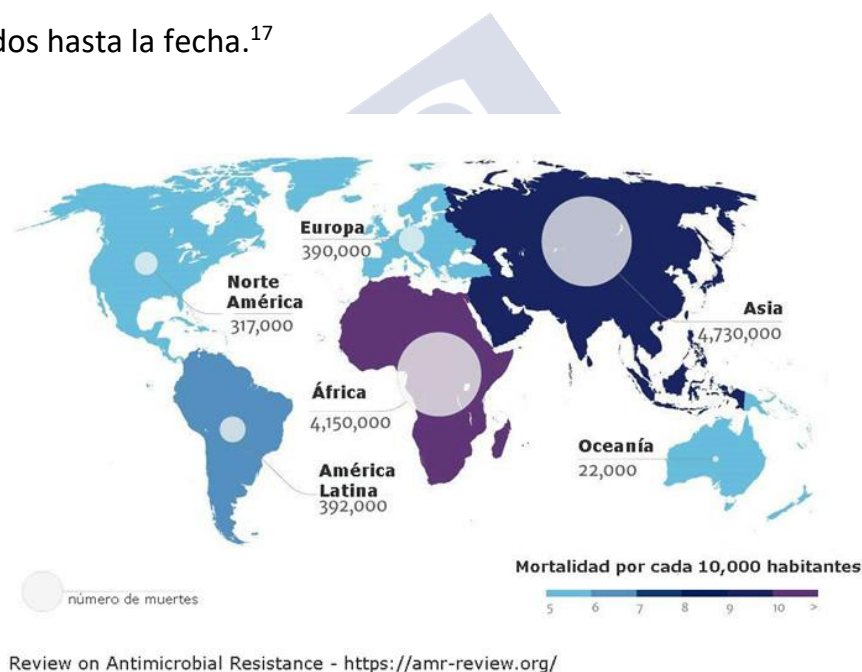


Figura 1. Mortalidad por infecciones fármaco resistentes estimada para el 2050.

Basándose en criterios como mortalidad, prevalencia de la resistencia, tratabilidad o número de potenciales fármacos en desarrollo, la OMS ha clasificado recientemente los patógenos resistentes a los antibióticos en de prioridad crítica, alta y media, como guía para la priorización de las iniciativas y actividades de I+D en el descubrimiento de nuevos antibióticos (Tabla 1).

¹⁶ a) <https://amr-review.org/> b) <http://agroavances.com/sabiasque-detalle.php?idSab=115>

¹⁷ Chellat, M. F.; Raguz, L.; Riedl, R. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55*, 6600–6626.

Tabla 1. Lista global de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo según la OMS

Prioridad	Patógeno
Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i> , resistente a los carbapenems
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , resistente a los carbapenems
	<i>Enterobacteriaceae</i> , ^a resistente a los carbapenems, resistente a cefalosporinas de 3ª generación
Elevada	<i>Enterococcus faecium</i> , resistente a la vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i> , resistente a la claritromicina
	<i>Staphylococcus aureus</i> , resistente a la meticilina, resistente a la vancomicina
	<i>Campylobacter</i> , resistente a la fluoroquinolona
	<i>Salmonella</i> spp., resistente a la fluoroquinolona
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , resistente a cefalosporinas de 3ª generación, resistente a la fluoroquinolona
Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , no susceptible a la penicilina
	<i>Haemophilus influenza</i> , resistente a la ampicilina
	<i>Shigella</i> spp., resistente a la fluoroquinolona

^aIncluye *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. y *Morganella* spp.

Las infecciones causadas por las bacterias Gram-negativas habituales en el ambiente hospitalario son las de mayor prioridad, junto con *Mycobacterium tuberculosis*. Esta última, que no está incluida en esta lista, es considerada desde hace muchos años una bacteria de prioridad global.¹⁸ Como se comentará en el apartado siguiente, dada la relevancia mundial de la tuberculosis junto con la falta de tratamientos eficientes frente a esta bacteria, en esta tesis doctoral nos hemos centrado en el desarrollo de antituberculostáticos con un diferente mecanismo de

¹⁸ WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. 2017. (https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/PPLreport_2017_09_19.pdf)

acción. Así mismo, hemos explorado el desarrollo de nuevos antibióticos frente a las infecciones causadas por *Helicobacter pylori*, una bacteria de prioridad crítica.

1.2 Impacto Social de los Patógenos *Mycobacterium tuberculosis* y *Helicobacter pylori*

Mycobacterium tuberculosis es el bacilo causante de la tuberculosis, una infección, principalmente, de las vías respiratorias, aunque puede afectar a otros órganos. El rango de incidencia de la tuberculosis varía según la región (la mayor parte de los casos se encuentran en la Región del sudeste de Asia), la edad (los adultos entre 25 y 44 años son los más afectados) y el sexo (se da en un 1.9% más en hombres que en mujeres).¹⁹ Está considerada por la OMS como prioridad global debido a varios factores:

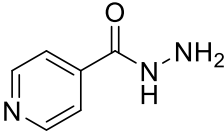
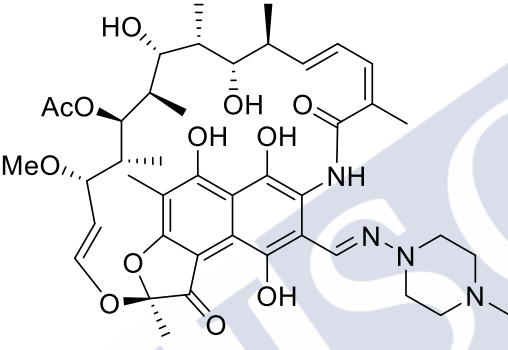
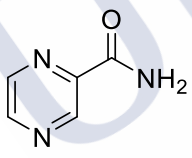
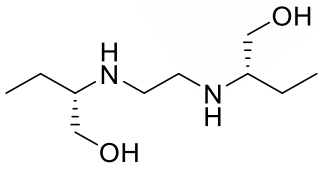
a) Infecta a más de un tercio de la población mundial y, aunque sólo un pequeño porcentaje llegará a desarrollar la enfermedad, las probabilidades se disparan exponencialmente en individuos con un débil sistema inmune, como es el caso de los diabéticos o las personas afectadas con el virus del SIDA. La tuberculosis es la enfermedad infecciosa que causa más muertes en el mundo, alcanzando la friolera cantidad de 1.8 millones de muertes al año.^{18,20} Según un reciente informe elaborado con datos del año 2017, a pesar de que la incidencia de la tuberculosis ha disminuido en casi un 5% desde el año 2008 en Europa, se han registrado 283.346 casos (30 por cada 100.000 habitantes), siendo un 10% de ellos letales, en los que no se incluyen las 24.000 muertes de pacientes también afectados con VIH. En todo el mundo, se registrarion 10 millones de enfermos infectados por esta bacteria en 2017.¹⁹

¹⁹ WHO. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe. 2019. (https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/tuberculosis-surveillance-monitoring-Europe-2019-20_Mar_2019.pdf)

²⁰ Pai, M.; Behr, M. A.; Dowdy, D.; Dheda, K.; Divangahi, M.; Boehme, C. C.; Ginsberg, A.; Swaminathan, S.; Spigelman, M.; Getahun, H.; Menzies, D.; Raviglione, M. *Nature reviews. Disease primers*. **2016**, 2, 1–23.

b) El tratamiento habitual de la tuberculosis consiste en la administración durante dos meses de un cóctel de cuatro fármacos: rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol, seguido de un tratamiento durante cuatro a seis meses con isoniazida y rifampicina (Tabla 2).^{21,19}

Tabla 2. Fármacos habituales en el tratamiento de la tuberculosis

Fármaco	Diana terapéutica
Isoniazida 	Enoil-ACP reductasa, implicada en la síntesis del ácido micólico (pared bacteriana).
Rifampicina 	ARN polimerasa, transcripción del ADN.
Pirazinamida 	Biosíntesis de ácidos grasos. Provoca además alteraciones en la membrana bacteriana e inhibe la proteína ribosomal S1 (RpsA).
Etambutol 	Transferencia de los ác. micólicos a la pared celular e inhibe la síntesis de arabinogalactano.

La duración tan prolongada del tratamiento hace que los pacientes tiendan a abandonar el tratamiento antes de tiempo ante la mejora inicial que se produce, lo que favorece la aparición de cepas resistentes (77.000 casos en Europa). Los pacientes con tuberculosis multirresistente necesitan complejos y prolongados tratamientos con varios fármacos de segunda línea, que son costosos y poco

²¹ Dover, L. G.; Coxon, G. D. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 6157–6165.

saludables (Figura 2).^{18,22,23,24} Sólo el 52% de los pacientes tratados con estos fármacos se llegan a curar.¹⁸

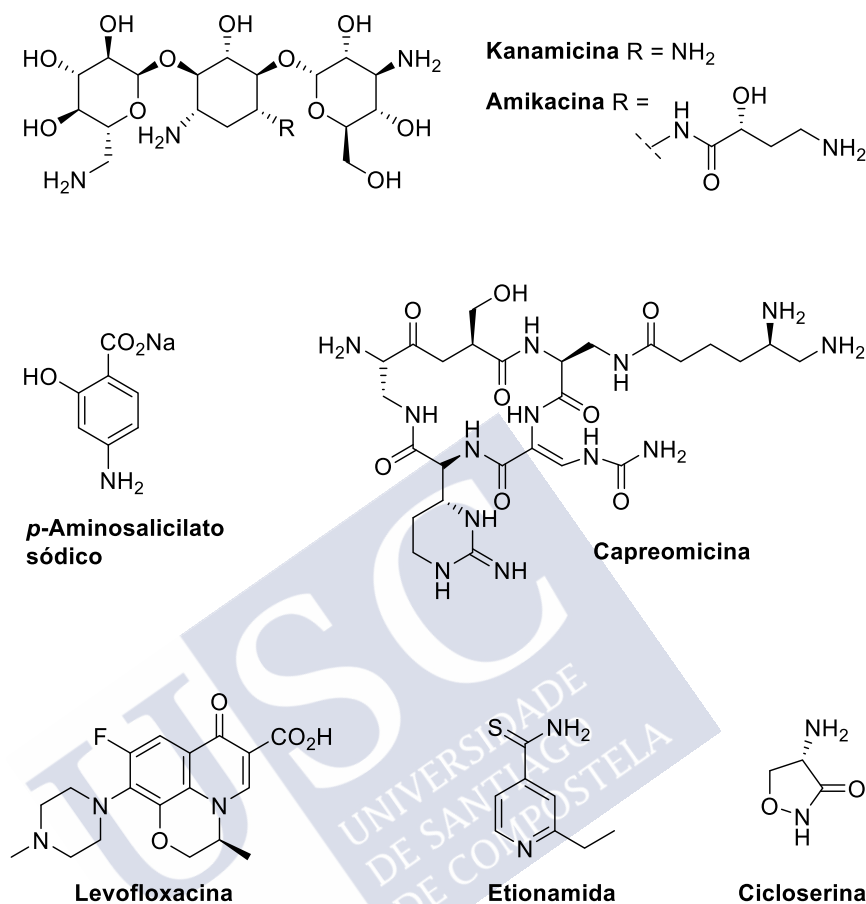


Figura 2. Fármacos de segunda línea en el tratamiento de la tuberculosis.

c) Los problemas más graves se encuentran en el caso de cepas extremadamente resistentes (XDRTB del inglés “Extremely resistant tuberculosis”), que son aquellas resistentes a la isoniazida y la rifampicina, así como a todas las fluoroquinolonas y a por lo menos uno de los tres medicamentos inyectables de la segunda línea como la kanamicina, la amikacina o la capreomicina.²² El 50% de las cepas resistentes llegan a ser XDRTB, donde sólo uno de cada tres pacientes infectados se cura.¹⁸ El número de cepas extremadamente resistentes en Europa ha

²² Gutiérrez-Lugo, M. T.; Bewley, A. C. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 2606–2612.

²³ Kim, D. H. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2008**, 178, 1075–1082.

²⁴ *The First New Tuberculosis Drug in Decades: Promise and Challenges.*
www.treatmentactiongroup.org/tagline/2011/winter/new-tb-drug_decades.

aumentado en los últimos años, alcanzándose un total de 5.591 casos en el 2017 frente a los 575 afectados del año 2013.¹⁹

d) En la actualidad existen nuevos compuestos para el tratamiento de la tuberculosis que se encuentran en diversos estadios de los ensayos clínicos,^{24,25} sin embargo, en los últimos 70 años, solamente se han comercializado dos nuevos antibióticos para el tratamiento de tuberculosis multirresistentes, ya que la inversión en I+D en este tipo de enfermedad se ha reducido drásticamente.¹⁸

La erradicación de la tuberculosis resulta difícil, no sólo por la aparición de cepas resistentes, si no por las características intrínsecas de la bacteria ya que es capaz de asumir un estado latente o inactivo con una mínima susceptibilidad a los antibióticos. Además, gracias a su capacidad de alojarse en sitios del organismo donde los linfocitos no pueden llegar, o bien no pueden actuar en su forma inmunogénica, el microorganismo es capaz de eludir la respuesta inmune. Por lo tanto, para hacer frente a este problema, existe una clara necesidad de desarrollar nuevos antituberculostáticos más eficaces que los existentes.

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa que causa gastritis crónica, está asociada con la úlcera gastroduodenal y es considerada por la OMS como agente carcinogénico de tipo I debido a su relación con el cáncer de estómago.²⁶ Aproximadamente, el 50% de la población mundial está infectada por *Helicobacter pylori*, desconociéndose, hasta el momento, el mecanismo exacto de transmisión entre personas aunque se sabe que tiene lugar fundamentalmente por las vías oral-oral o fecal-oral. Su prevalencia muestra una alta variabilidad según la región geográfica, etnia, raza, edad y factores socioeconómicos, siendo mucho más prevalente en países en vías de desarrollo.²⁷

²⁵ <http://www.newtbdrugs.org/pipeline.php>

²⁶ Bang-Le, Z.; Cheng-Qi, F.; Lei, D.; Fang-Dao, W. Y.; Jian-Min, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 5285–5264.

²⁷ Organización Mundial de Gastroenterología, *Helicobacter pylori* en los países en desarrollo, 2010. (<http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/helicobacter-pylori-spanish-2010.pdf>)

La terapia habitual consiste en el tratamiento durante 10–14 días con un inhibidor de la bomba de protones, como el omeprazol, el pantoprazol o el lanzoprazol, y dos antibióticos, la claritromicina, la amoxicilina o el metronidazol (Figura 3).²⁸

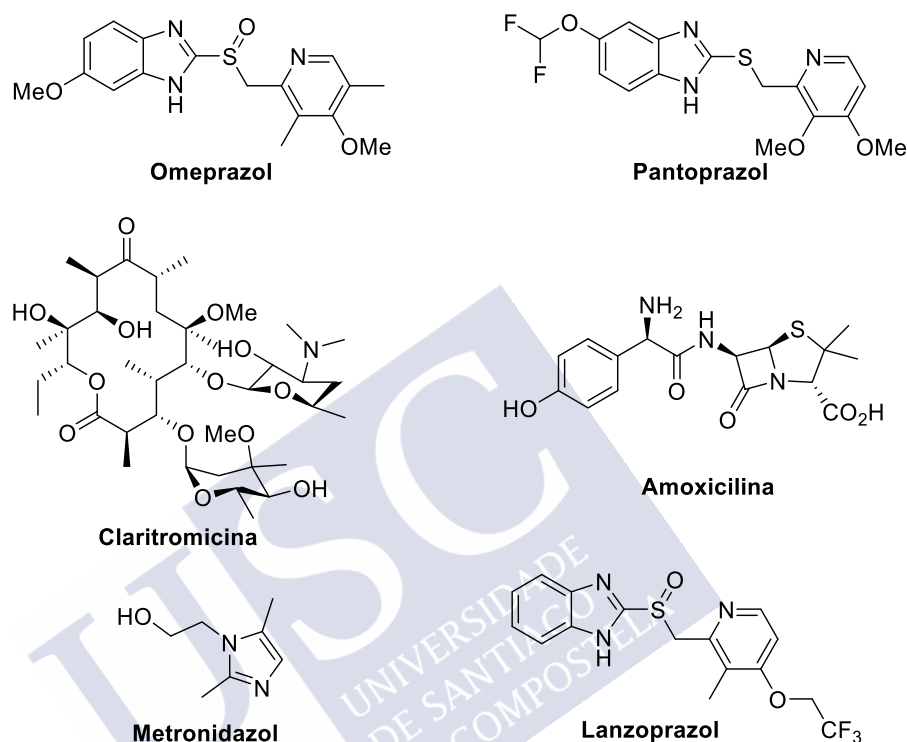


Figura 3. Fármacos utilizados en el tratamiento de las infecciones causadas por *H. pylori*.

Uno de los problemas más importantes del tratamiento de las infecciones causadas por *H. pylori* es que esta bacteria se encuentra adherida a la mucosa gástrica. En esta zona es difícil alcanzar la concentración suficiente de antibiótico. Además, en este caso, el microorganismo se fija a las células de la mucosa gástrica, al menos en un 20% más de las que se encuentran en suspensión, lo que dificulta aún más su erradicación. Por otra parte, al gradiente de pH que se produce entre el

²⁸ Tepes, B.; O'Connor, A.; Gisbert, J. P.; O'Morain, C. *Helicobacter*. **2012**, 17, 36–42.

lume gástrico (pH 2) y la mucosa gástrica (pH 7) provoca la inactivación de algunos antibióticos.^{29,30}

Desafortunadamente, a las dificultades anteriormente mencionadas se añade la creciente aparición de cepas resistentes al metronidazol y más recientemente a la claritromicina, la cual varía según la región y la edad llegando incluso al alarmante porcentaje de resistencia al metronidazol del 90% en la India (Figura 4).^{31,32,33,34}

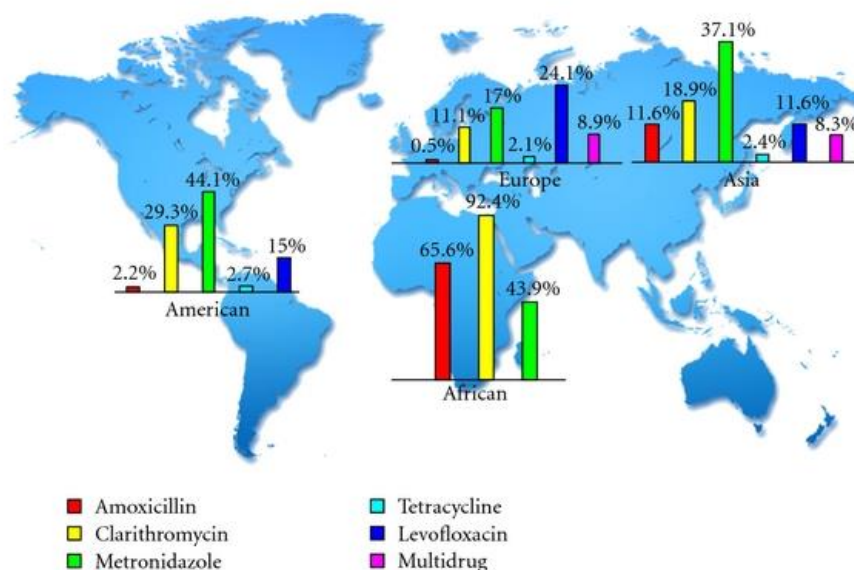


Figura 4. Resistencia a los fármacos para el tratamiento de las infecciones causadas por *H. pylori*.

1.3 Necesidad de Antibióticos con un Nuevo Mecanismo de Acción.

Potencial Terapéutico de los Enzimas de la Ruta del Ácido Siquímico

Hasta ahora la estrategia más empleada por la industria farmacéutica de cara al desarrollo de nuevos antibióticos, ha sido la modificación química de otros anteriormente descubiertos para hacerlos más eficaces frente a las bacterias

²⁹ Sjostrom, J. E.; Larsson, H. J. *Med. Microbiol.* **1996**, *44*, 425–433.

³⁰ Grahan, D. Y.; Shiotani, A. *Nat. Clin. Prac. Gastroenterol. Hepatol.* **2008**, *5*, 321–331.

³¹ Mégraud, F. *Gut.* **2004**, *53*, 1374–1384.

³² O'Connor, A.; Gisbert, J. P.; McNamara, D.; O'Morain, C. *Helicobacter.* **2010**, *15*, 46–52.

³³ Wu, W.; Yang, Y.; Sun, G. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2012**, *2012*, 1–8.

³⁴ Thaker, Y.; Moon, A.; Afzali, A. *J. Clin. Gastroenterol. Treat.* **2016**, *2*, 1–5.

multirresistentes. Sin embargo, esta metodología no resulta muy eficaz a largo plazo debido a la gran adaptabilidad y al carácter evolutivo intrínseco de las bacterias que favorece la rápida aparición de resistencia. Además, este fenómeno potencia aún más la aparición de resistencia, al incidir sobre el mismo tipo de dianas terapéuticas para las que la bacteria ya ha desarrollado mecanismos de defensa muy eficientes. En concreto, los antibióticos en uso clínico inciden sobre un reducido número de objetivos biológicos (aprox. 25): la síntesis de proteínas, la biosíntesis de la pared celular, la replicación del ADN, la transcripción del ARN, la biosíntesis de folato y la estructura de la membrana. Por lo tanto, no sólo existe una clara necesidad de disponer de terapias alternativas para el tratamiento de aquellas infecciones para las que los antibióticos disponibles no son eficaces, como son las infecciones hospitalarias (nosocomiales) o las causadas por bacterias de difícil tratamiento como la tuberculosis, sino además, es importante que esos nuevos compuestos incidan sobre objetivos biológicos inexplorados, clave para la supervivencia de la bacteria. Estos nuevos antibióticos podrían utilizarse bien aisladamente o en combinación con los ya disponibles si se produce sinergia entre los mismos.³⁵

Por otra parte, los avances logrados en los últimos años en las tecnologías de secuenciación del genoma ha permitido ampliar el conocimiento sobre qué genes son esenciales para la supervivencia de las bacterias, así como los enzimas/proteínas para los que codifican.^{36,37,38,39} A esto hay que sumarle además el gran avance logrado en la resolución y la disponibilidad de numerosas estructuras cristalográficas de un amplio número de enzimas/proteínas clave en el

³⁵ Walsh, C. *Microbiology*. **2003**, 1, 65–70.

³⁶ <http://www.essentialgene.org>

³⁷ Mills, S. D. J. *Antimicrob. Chemother.* **2003**, 51, 749–752.

³⁸ Zhen, C. J.; Yap, C. W.; Ji, Z. L.; Cao, Z. W.; Chen, Y. Z. *Pharmacol. Rev.* **2006**, 58, 259–279.

³⁹ <http://targetdb-dev.rutgers.edu>

metabolismo de las bacterias, que son una herramienta fundamental en el diseño racional de inhibidores y antagonistas.

Con el objetivo de estudiar el potencial terapéutico de objetivos bacterianos poco explorados, así como el desarrollo de compuestos de bajo peso molecular capaces de modular su actividad, en nuestro grupo de investigación nos hemos centrado en estudiar algunos de los enzimas de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, también conocida como la ruta del ácido siquímico. Mediante esta ruta siete enzimas catalizan la conversión de la eritrosa-4-fosfato (**1**) y el fosfoenolpiruvato (**2**) en ácido corísmico (**9**), que es el precursor de los aminoácidos esenciales, triptófano, tirosina y fenilalanina, así como toda una serie de compuestos aromáticos importantes, como el ácido fólico, las ubiquinonas y las vitaminas E y K (Esquema 1).^{40,41,42,43,44} Esta ruta está presente en las bacterias, los hongos, y en algunos parásitos del género apicomplexa⁴⁵, como *Toxoplasma gondii*, el *Plasmodium falciparum* (responsable de la malaria) y el *Cryptosporidium parvum*, pero lo más importante, no está presente en los animales. Hoy en día se han secuenciado todos los genes que codifican para los distintos enzimas que intervienen en la ruta del ácido siquímico. Cabe destacar que seis de los siete enzimas de la ruta del ácido siquímico son esenciales para la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*aroF*, *aroG*, *aroB*, *aroD*, *aroE*, *aroK*⁴⁶ y *aroA*)³⁶. En el caso de *Helicobacter pylori*, cuatro genes son esenciales (*aroQ*, *aroE*, *aroK* y *aroC*).³⁶

⁴⁰ Abell, C. *Enzymology and molecular biology of the shikimate pathway*. En: *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Sankawa, U., Ed. Elsevier Science Ltd.: Oxford, 1998, vol. 1, pág. 573–607.

⁴¹ Haslam, E. *The Shikimate pathway: Metabolism and Metabolites* Wiley, New York, 1974.

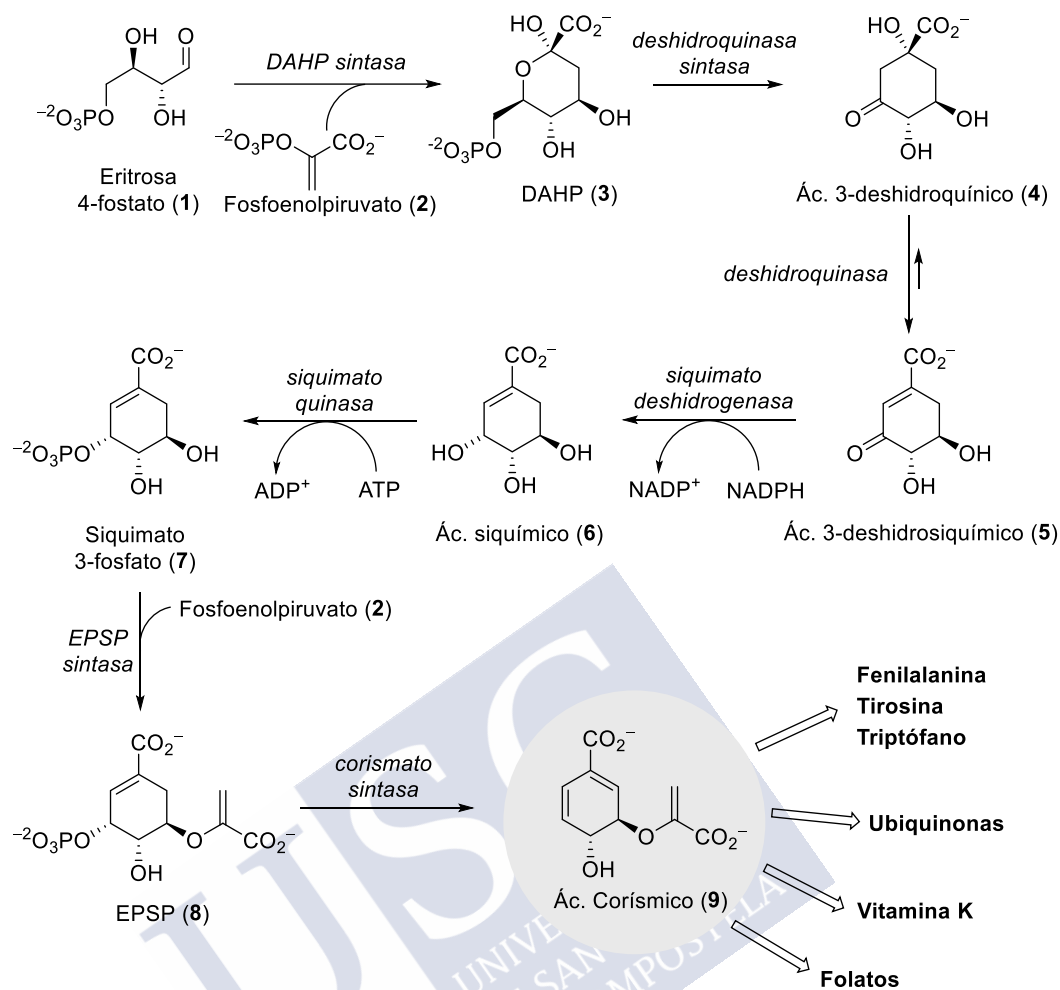
⁴² Herrmann, K.; Weaver, L. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **1999**, *50*, 473–755.

⁴³ Gibson, F.; Pittard, J. J. *Bacteriol. Rev.* **1968**, *32*, 465–492.

⁴⁴ Braus, G. H. *Microbiol. Rev.* **1991**, *55*, 349–370.

⁴⁵ Roberts, F.; Roberts, C. W.; Johnson, J. J.; Kyle, D. E.; Krell, T.; Coggins, J. R.; Coombs, G. H.; Milhous, W. K.; Tzipori, S.; Ferguson, D. J. P.; Chakrabarti, D.; McLeod, R. *Nature*. **1998**, *393*, 801–805.

⁴⁶ Parish, T.; Stoker, N. G. *Microbiology*. **2002**, *148*, 3069–3077.



Esquema 1. La ruta del ácido siquímico.

La primera etapa de la ruta del ácido siquímico consiste en la condensación de la eritrosa-4-fosfato (1) y el fosfoenolpiruvato (2) proporcionando la 3-deoxi-D-arabinoheptulosanato 7-fosfato (3) y fosfato y la cataliza la DAHP sintasa (EC 4.1.2.15).⁴⁷ A continuación, la 3-deshidroquinato sintasa (EC 4.6.1.3) utilizando NAD⁺ proporciona el ácido 3-deshidroquinico (4), cuya deshidratación catalizada por la deshidroquinasa (EC 4.2.1.10) conduce al ácido 3-deshidrosiquímico (5). La siquimato deshidrogenasa (EC 1.1.1.25) logra la conversión del ácido 3-deshidrosiquímico en ácido siquímico (6) en presencia de un cofactor, el NADPH. El quinto enzima de la ruta, la siquimato quinasa (EC 2.7.1.71), dota de un grupo fosfato al grupo hidroxilo en posición C3 del ácido siquímico (6) mediante la

⁴⁷ González-Bello, C. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, 16, 960–977.

transferencia de este grupo fosfato del ATP proporcionando el siquimato-3-fosfato (7). La condensación reversible entre el siquimato-3-fosfato (7) y el fosfoenolpiruvato (2) se logra mediante la catálisis por la EPSP sintasa (2.5.1.19) que produce el 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (8). La última reacción de la ruta está catalizada por la corismato sintasa (EC 4.6.1.4) y logra el ácido corísmico (9) mediante una eliminación 1,4-*anti* de fosfato a través de la substracción del hidrógeno *pro*-R en C6.

La ausencia de la ruta del ácido siquímico en animales,⁴⁸ junto con su carácter esencial en ciertos microorganismos⁴⁹ la convierte en un atractivo objetivo para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.⁵⁰ Un excelente ejemplo de ello es el glifosato [*N*-(fosfonometil)glicina], el componente activo en herbicidas bien conocidos como RoundUp,[®] Zero[®] y Tumbleweed[®]. Este compuesto es un inhibidor específico del sexto enzima de la ruta, EPSP sintasa (EC 2.5.1.19),⁵¹ con una K_i de 1 μ M. Estudios estructurales demostraron que el glifosato ocupa el centro de unión del fosfoenolpiruvato (2) en el enzima, mimetizando un estado intermedio del complejo ternario enzima/sustratos.⁵² Además, es eficaz frente a varios parásitos apicomplexa incluyendo los causan la malaria y la toxoplasmosis⁴⁵ y ha demostrado ser efectivo *in vitro* frente a cepas resistentes a fármacos antimaláricos como la

⁴⁸ Bentley, R. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1990**, 25, 307–384.

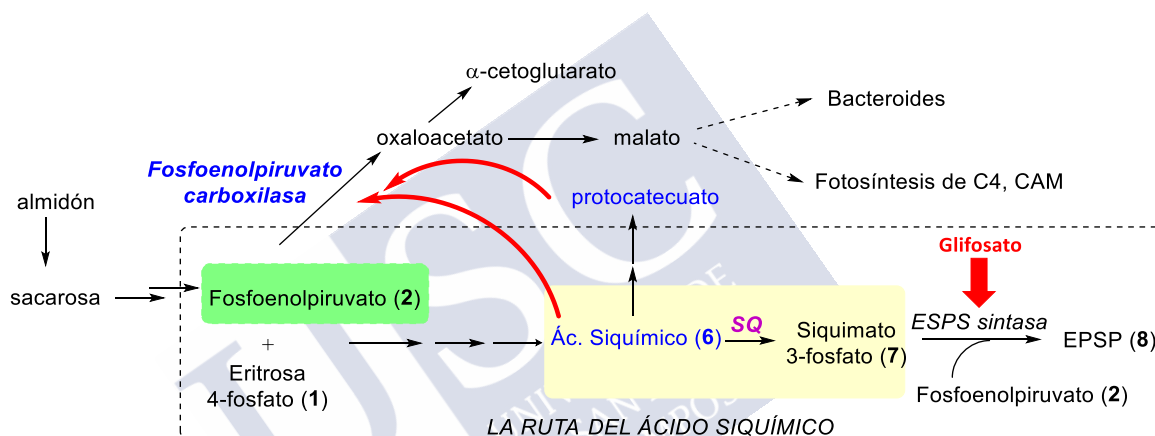
⁴⁹ a) Salama, N. R.; Shepherd, B.; Falkow, S. *J. Bacteriol.* **2004**, 186, 7926–7935. b) Sasseti, C. M.; Boyd, D. H.; Rubin, E. J. *Mol. Microb.* **2003**, 48, 77–84. c) de Berardinis, V.; Vallenet, D.; Castelli, V.; Besnard, M.; Pinet, A.; Cruaud, C.; Samair, S.; Lechaplais, C.; Gyapay, G.; Richez, C.; Durot, M.; Kreimeyer, A.; Le Fèvre, F.; Schächter, V.; Pezo, V.; Döring, V.; Scarpelli, C.; Médigue, C.; Cohen, G. N.; Marlière, P.; Salanoubat, M.; Weissenbach, J. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, 4, 1–15.

⁵⁰ Mduli, K.; Spigelman, M. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, 6, 459–467.

⁵¹ a) Steinrücken, H. C.; Amrhein, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, 94, 1207–1212. b) Franz, J. E.; Mao, M. K.; Sikorski, J. A. *Glyphosate: a unique global herbicide*. Washington, DC: American Chemical Society Monograph 189; American Chemical Society; 1997. c) Sikorski, J. A.; Gruys, K. *J. Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 2–8. d) Franz, J. E. *The herbicide glyphosate*. Grossbard, E. y Atkinson, D., Eds. Boston, MA: Butterworths; 1985, pág. 3–17. e) Steinrücken, H. C.; Amrhein, N. *Eur. J. Biochem.* **1984**, 143, 351–357. f) Priestman, M. A.; Healy, M. L.; Funke, T.; Becker, A.; Schönbrunn, E. *FEBS Lett.* **2005**, 579, 5773–5780.

⁵² a) Schönbrunn, E.; Eschenburg, S.; Shuttleworth, W. A.; Schloss, J. V.; Amrhein, N.; Evans, J. N. S.; Kabsch, W. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2001**, 98, 1376–1380. b) Funke, T.; Han, H.; Healy-Fried, M. L.; Fisher, E. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2006**, 103, 13010–13015.

pirimitamina.⁵³ Por otra parte, De María y colaboradores⁵⁴ demostraron que las propiedades antimicrobianas del glifosato no solo se deben a la inhibición de la EPSP sintasa, sino además, a las elevadas concentraciones de ácido siquímico (6) y protocatecuato que causa dicha inhibición. La presencia en exceso de dichos compuestos inhibe la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC. 4.1.1.31), enzima implicado en el metabolismo de los carbohidratos, provocando la disminución de la producción de oxalacetato y malato y su disponibilidad en el metabolismo de los bacteroides, lo que provoca una disminución de la fijación de nitrógeno (nitrogenasa) (Esquema 2).



Esquema 2. Modo de acción propuesto para el glifosato. Causa alteraciones en la ruta del ácido siquímico y en el funcionamiento del enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.

Por otra parte, Chen y colaboradores⁵⁵ demostraron que la supresión del gen *aroK* que codifica para la siquimato quinasa (SQ), como el glifosato, causa la acumulación de ácido siquímico (6). Esto sugiere que quizás sería posible bloquear la biosíntesis de los aminoácidos esenciales también mediante la inhibición del enzima SQ. Además, al tratarse de un enzima esencial en *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Acinetobacter baylyi*, *Haemophilus influenzae*, *Francisella novicida* y *Pseudomonas aeruginosa*, sería una excelente diana para el desarrollo de nuevos antibióticos contra un amplio número de patógenos

⁵³ McConkey, G. A.; Pinney, J. W.; Westhead, D. R.; Plueckhahn, K.; Flitzpatrick, T. B.; Macheroux, P.; Kappes, B. *Trend in Parasitology* **2004**, *20*, 60–65.

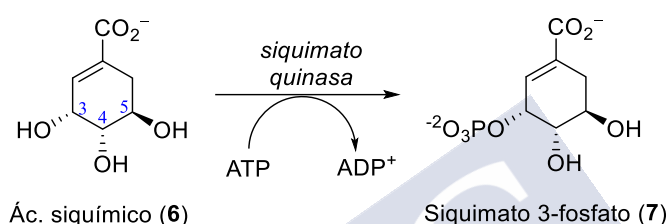
⁵⁴ De María, N.; Becerril, J. M.; García-Plazaola, J. I.; Hernández, A.; De Felipe, M. R.; Fernández-Pascual, M. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2621–2328.

⁵⁵ Chen, K.; Dou, J.; Tang, S.; Yang, Y.; Wang, H.; Fang, H.; Zhou, C. *Bioresour. Technol.* **2012**, *119*, 141–147.

importantes. De ahí que el objetivo general de esta tesis doctoral sea el desarrollo racional de inhibidores de bajo peso molecular capaces de bloquear el enzima SQ.

1.4 El Enzima Siquimato Quinasa

La SQ cataliza la fosforilación selectiva del grupo hidroxilo del C3 del ácido siquímico (**6**) mediante la transferencia del γ -fosfato del ATP al grupo hidroxilo proporcionando el siquimato 3-fosfato (**7**) y ADP (Esquema 3).



Esquema 3. La reacción catalizada por la Siquimato quinasa.

La SQ es un enzima dependiente de Mg^{2+} que dispone de dos centros de reconocimiento, uno para el ácido siquímico (6) y otro para el cofactor (ATP), con interacciones clave diferentes en ambos casos. La estructura global de la SQ consiste en cinco láminas β paralelas rodeadas por ocho hélices α .⁵⁶ El enzima posee tres dominios importantes^{57,58} (Figura 5):

- 1) El dominio CORE, que contiene las cinco láminas β paralelas y el bucle P (residuos 9–17) con una secuencia que se conserva GXXXGKT/S (siendo X cualquier residuo) conocida como el motivo Walker A, es el centro de unión del ATP y el ADP.⁵⁹
- 2) El LID (residuos 112–114), un bucle helicoidal dinámico que se cierra sobre el centro activo a modo de tapa y contiene residuos que son clave para la catálisis y la unión del ATP.

⁵⁶ a) Krell, T.; Coggins, J. R.; Laphorn, A. J. *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 983–997. b) Gu, Y.; Reshetnikova, L.; Li, Y.; Wu, Y.; Yan, H.; Singh, S.; Ji, X. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 779–789.

⁵⁷ Dhaliwal, B.; Nichols, C. E.; Ren, J.; Lockyer, M.; Charles, I.; Hawkins, A. R.; Stammers, D. K. *FEBS Lett.* **2004**, *574*, 49–54.

⁵⁸ La numeración corresponde a la SQ procedente de *M. tuberculosis*.

⁵⁹ Walker, J. E.; Saraste, M.; Runswick, M.; Gay, N. J. *EMBO J.* **1982**, *1*, 945–951.

3) El dominio SB (SB del inglés shikimic binding) de unión al ácido siquímico (residuos 33–61 y hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$).

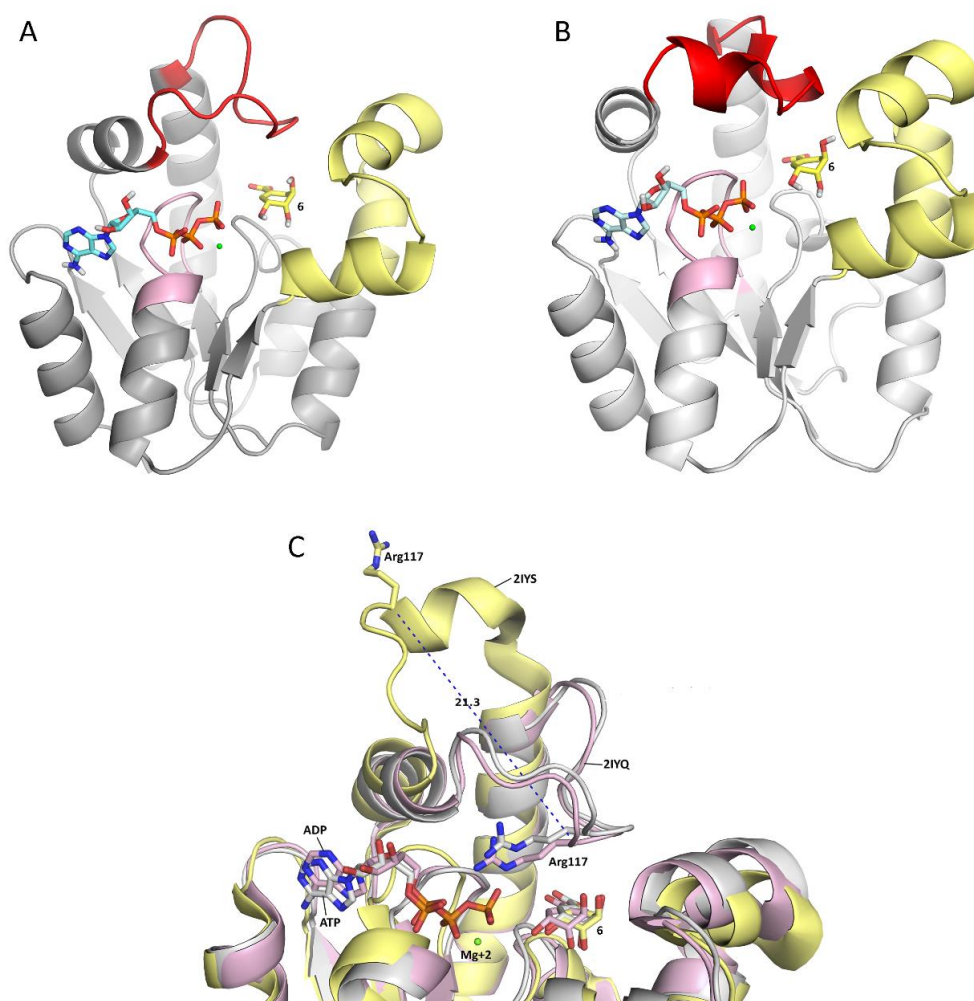


Figura 5. A, B. Complejos de Michaelis de las SQ procedentes de *M. tuberculosis* (A) y *H. pylori* (B) obtenidos mediante estudios de Dinámica Molecular.⁶⁰ Se representan los tres dominios importantes: CORE (rosa), LID (rojo) y SB (amarillo). Se muestra la posición de los sustratos, ATP (celeste) y ácido siquímico (6, amarillo), y del Mg^{2+} (esfera verde). C. Superposición de las estructuras cristalinas de los complejos SQ-Mt/ADP/6 (PDB 2IYQ,⁶¹ rosa) y el SQ-Mt/6 (PDB 2IYS,⁶¹ amarillo) y del complejo de Michaelis SQ-Mt (gris). Se observa que en ausencia de ADP el LID está en la conformación abierta y la Arg117 esencial se sitúa a más de 20 Å del centro activo.

En base a la disposición observada en la estructura cristalográfica de la SQ procedente de *M. tuberculosis* (SQ-Mt) con el ADP y el ácido siquímico en el centro

⁶⁰ Blanco, B.; Prado, V.; Lence, E.; Otero, J. M.; Garcia-Doval, C.; Van Raaij, M. J.; Llamas-Saiz, A. L.; Lamb, H.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. J. *Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12366–12376.

⁶¹ Cheng, W. C.; Chen, Y. F.; Wang, H. J.; Hsu, K. C.; Lin, S. C.; Chen, T. J.; Yang, T. J. *PLOS ONE*. **2012**, *364*, 411–423.

activo (PDB 2IYQ, Figura 5C), Hartmann y colaboradores⁶² propusieron que la transferencia de fosforilo transcurriría a través de un mecanismo asociativo, es decir, mediante la formación de un intermedio pentacoordinado entre ambos sustratos. Los autores sugirieron además que el proceso lo desencadenaría el residuo conservado Asp34 (en *M. tuberculosis*), que actuaría como base general arrancando el protón del grupo hidroxilo en posición C3, y así el alcóxido generado produciría un ataque nucleófilo sobre el grupo γ -fosfato del ATP. Sin embargo, estudios de RMN y computacionales llevados posteriormente a cabo en nuestro grupo de investigación demostraron que no se trata de un proceso asociativo, sino disociativo, y por lo tanto no tiene lugar la formación de un intermedio covalente pentacoordinado entre ambos sustratos.⁶³ La reacción enzimática se iniciaría con la generación de un metafosfato intermedio (PO_3^-) a través de la rotura del enlace y O–P del ATP, seguido del ataque nucleófilo del grupo hidroxilo en C3, siendo esta última la etapa limitante del proceso. El residuo Asp34 actuaría como base general en el último paso de desprotonación del producto de reacción. Por lo tanto, el cofactor no participaría en el estado de transición clave en el proceso.

El dominio SB es muy conservado y contiene numerosos residuos cargados, en concreto Arg132/Arg136, Arg57/Arg58, Glu60/Glu61 y Asp33/Asp34 (en *H. pylori* y *M. tuberculosis*, respectivamente), así como un bolsillo apolar formado principalmente por los residuos de Phe48/Phe49, Phe56/Phe57, Ile36/Ile37 y Val44/Ile45 (en *H. pylori* y *M. tuberculosis*, respectivamente) (Figura 6).

⁶² Hartmann, M. D.; Bourenkov, G. P.; Oberschall, A.; Strizhov, N.; Bartunik, H. D. *J. Mol. Biol.* **2006**, *364*, 411–423.

⁶³ Prado, V.; Lence, E.; Vallejo, J. A.; Beceiro, A.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 2758–2768.

	10 20 30 40 50
SQ-Mt	-MAPK--AVL VGLPGSGKST IGRRLAKALG VGLLDTDVAI EQRTGRSIAD
SQ-Hp	----MQHLVL IGFMGSGKSS LAQELGLALK LEVLDTDMI SERVGLSVRE
SQ-Hp*	----MQHLVL IGFMGSGKSS LAQELGLALK LEVLDTDMI SERVGLSVRE
SQ-Ec	-MAEKRNI FL VGPMGAGKST IGRQLAQQLN MEFYDSQEI EKRTGADVGV
SQ-Sa	MNHDKSPIIL IGFMGTGKST IGKYVADEQN LSFIDIDSY EEKYKLTIPE
SQ-St	-MAEKRNI FL VGPMGAGKST IGRQLAQQLN MEFYDSQEI EKRTGADVGV

	60 70 80 90 100
SQ-Mt	IFATDGEQEF RRIEEDVVRA ALADHD-GVL SLGGGAVTSP GVRAALAGH-
SQ-Hp	IFEELGEDNF RMFEKNLIDE LKTLKTPHVI STGGGIVMHE N----LKGLG
SQ-Hp*	IFEELGEDNF RMFEKNLIDE LKTLKTPHVI STGGGIVMHE N----LKGLG
SQ-Ec	VFDLEGEEGF RDREEKVINE LTEKQG-IVL ATGGGSVKSR ETRNRLSARG
SQ-Sa	IFCKHGEQYF RNLEFTCLQE CINTAD--II ATGGGIIIESE EAFNFKNQK
SQ-St	VFDVEGEDGF RNREEKVINE LTEKQG-IVL ATGGGSVKSR ETRNRLSARG

	110 120 130 140 150
SQ-Mt	TVVYLEISAA EGVRTTGGNT --VRPLLAPG DR-AEKYRAL MAKRAPLYRR
SQ-Hp	TTFYLKMDFE TLIKRLNQKE REKRPLLNNL TQAKELFE-- --KRQALY EK
SQ-Hp*	TTFYLKMDFE TLIKRLNQKE REKRPLLNNL TQAKELFE-- --KRQALY EK
SQ-Ec	VVYLETETIE KQLARTQRDK --KRPLLHVE TPPREVLEAL ANERNPLYEE
SQ-Sa	NIIWLD CNID IIYSRINDDP --HRPNAN-- NKTIKQLNDL YCSRNLRYNE
SQ-St	VVYLETETIE KQLARTQRDK --KRPLLQVE APPREVLEAL ANERNPLYEE

	160 170 180
SQ-Mt	VATMRVDTNR RNPGAVVRHI LSRLQVSPS EAAT
SQ-Hp	NASFIIDARG -GLNNSLKQV LQFIA-----
SQ-Hp*	NASFIIDARG -GLNNSLKQV LQFIA-----
SQ-Ec	IADVTIRTDD QSAKVVANQI IHMLESN---
SQ-Sa	IAFKKFDSHL LSISEIYYEL LNLIKASDQY ----
SQ-St	IADVTIRTDD QSAKVVANQI IHMLESN---

Figura 6. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las SQ procedentes de *M. tuberculosis*, *H. pylori*, *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhi*. Para el enzima *H. pylori*, se muestran dos cepas: AROK_HELPJ, Q9ZMS3 (cepa J99/ATCC 700824) y una cepa clínicamente aislada en el hospital de Guadalajara (España) que hemos utilizado en esta tesis doctoral. El alineamiento se realizó utilizando el programa CLUSTAL Omega.⁶⁴ Los residuos modificados en la cepa clínica aislada se destacan en rojo. Los residuos conservados se resaltan en amarillo.

Estudios de dicroísmo circular⁶¹, de fluorescencia⁶⁵ y cristalográficos⁶² sugieren que, en primer lugar, el ATP se une al enzima induciendo un cambio conformacional en el dominio LID que provoca su plegamiento sobre el centro activo a modo de tapa. A continuación, el ácido siquímico (**6**) se une al centro activo y el dominio LID se pliega sobre el mismo, adoptando una conformación totalmente cerrada del

⁶⁴ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

⁶⁵ Krell, T.; Maclean, J.; Boam, D. J.; Cooper, A.; Resmini, M.; Brocklehurst, K.; Kelly, S. M.; Price, N. C.; Laphorn, A. J.; Coggins, J. R. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1137–1149.

centro activo, en la cual la cadena lateral del residuo de Arg116/Arg117 (en *H. pylori* y *M. tuberculosis*, respectivamente) se encuentra dentro del centro activo estableciendo una fuerte interacción electrostática con el grupo γ -fosfato del ATP.^{62,60} La posición del ATP en el centro activo está fijada mediante la interacción de apilamiento catión- π entre el grupo adenosina del ATP y el grupo guanidinio del residuo conservado Arg107/Arg110 (en *H. pylori* y *M. tuberculosis*, respectivamente). La comparación de las estructuras cristalográficas de los complejos SQ-Mt/ADP/6 (PDB 2IYQ⁶²) y SQ-Mt/6 (PDB 2IYS⁶²), muestra que, en ausencia de ADP, el LID se encuentra en su conformación abierta y la Arg117 esencial se sitúa a más de 20 Å de distancia del centro activo (Figura 5C). Por el contrario, en presencia de ADP, el LID adopta una disposición cerrada situando así la arginina esencial dentro del centro activo. Como se comentará más adelante, la proximidad de la arginina esencial al cofactor es lo que desencadena la catálisis.

1.5 Conformación Activa del Ácido Siquímico en el Centro Activo de la SQ

En las estructuras cristalográficas disponibles de la SQ con el ácido siquímico (6) en el centro activo se observa, que el enzima reconoce una conformación de alta energía del sustrato natural en la que dos de sus tres grupos hidroxilos están en disposición axial (posiciones C4 y C5). Con ello, el enzima fuerza esta disposición con el fin de lograr una disposición ecuatorial del grupo hidroxilo que fosforila de forma selectiva, el grupo hidroxilo en C3. Para analizar la relevancia de las interacciones que controlan la estabilización de esta inusual conformación del ácido siquímico (6) en el centro activo de ambas SQ, en nuestro grupo de investigación se llevaron a cabo estudios de Dinámica Molecular (DM).⁶⁰ Este tipo de estudios, complejos y exigentes computacionalmente, consideran que tanto la macromolécula como los ligandos son flexibles, y se realizan sumergiendo el complejo enzima/ligando(s) en un octaedro truncado de moléculas de agua obtenidas con el campo de fuerza de mecánica molecular AMBER lo que simula el medio fisiológico de las mismas. Todo ello permite reproducir de modo más realista

el comportamiento dinámico de los enzimas, lo que habitualmente se conoce como modelo inducido, es decir, la macromolécula cambia su conformación para maximizar las interacciones con los ligandos. Los estudios de DM permiten además conocer en detalle los cambios conformacionales necesarios para que ese reconocimiento tenga lugar y también elucidar el rol de los residuos conservados del centro activo, así como la fortaleza de las interacciones. Al mismo tiempo permite validar el modo de unión obtenido por técnicas más sencillas como el modelado molecular (docking) y así descartar posibles artefactos. Es decir, si la conformación inicial es realista, el ligando permanecerá en la misma disposición durante toda la simulación. En cambio, si se trata de un artefacto el ligando acabará desplazándose de la zona de unión inicial o incluso será expulsado del bolsillo.

Los estudios de DM realizados con el complejo Michaelis de la SQ-Mt (SQ-Mt/ATP/6) demostraron que las interacciones polares (enlace de hidrógeno y electrostáticas) que parecen controlar la conformación de alta energía del sustrato natural son muy robustas y estables en el tiempo (Figuras 7A y 7B). En concreto, el sustrato se une en primer lugar al centro activo mediante un puente salino entre el grupo carboxilato en 6 y el grupo guanidinio del residuo conservado Arg136. La conformación diaxial del ciclohexeno se logra mediante grupos de interacciones de enlace de hidrógeno en ambas caras del anillo, que fijan los grupos hidroxilos en C4 y C5 en dicha posición. Para el grupo hidroxilo en C4 son dos interacciones, una con la cadena lateral del residuo de Asp34 y otra con la base del centro activo a través del agua estructural (WAT1) que se observa en todas las estructuras cristalográficas disponibles, la cual no se intercambia con el disolvente durante toda la simulación (Figura 7C). A través de la molécula de agua WAT1 el grupo hidroxilo en C4 interacciona con los residuos conservados Glu61 y Arg58 y el grupo NH de la cadena principal del residuo conservado Gly81. Entre los residuos Asp34 y Glu61 siempre hay una molécula de agua, probablemente para evitar la repulsión entre ambos. Además de las interacciones mencionadas, la disposición axial del grupo hidroxilo

en C4 también está estabilizada por el bolsillo apolar formado por los residuos conservados Phe49 y Phe57, que aislan del disolvente esta importante zona de reconocimiento del centro activo.

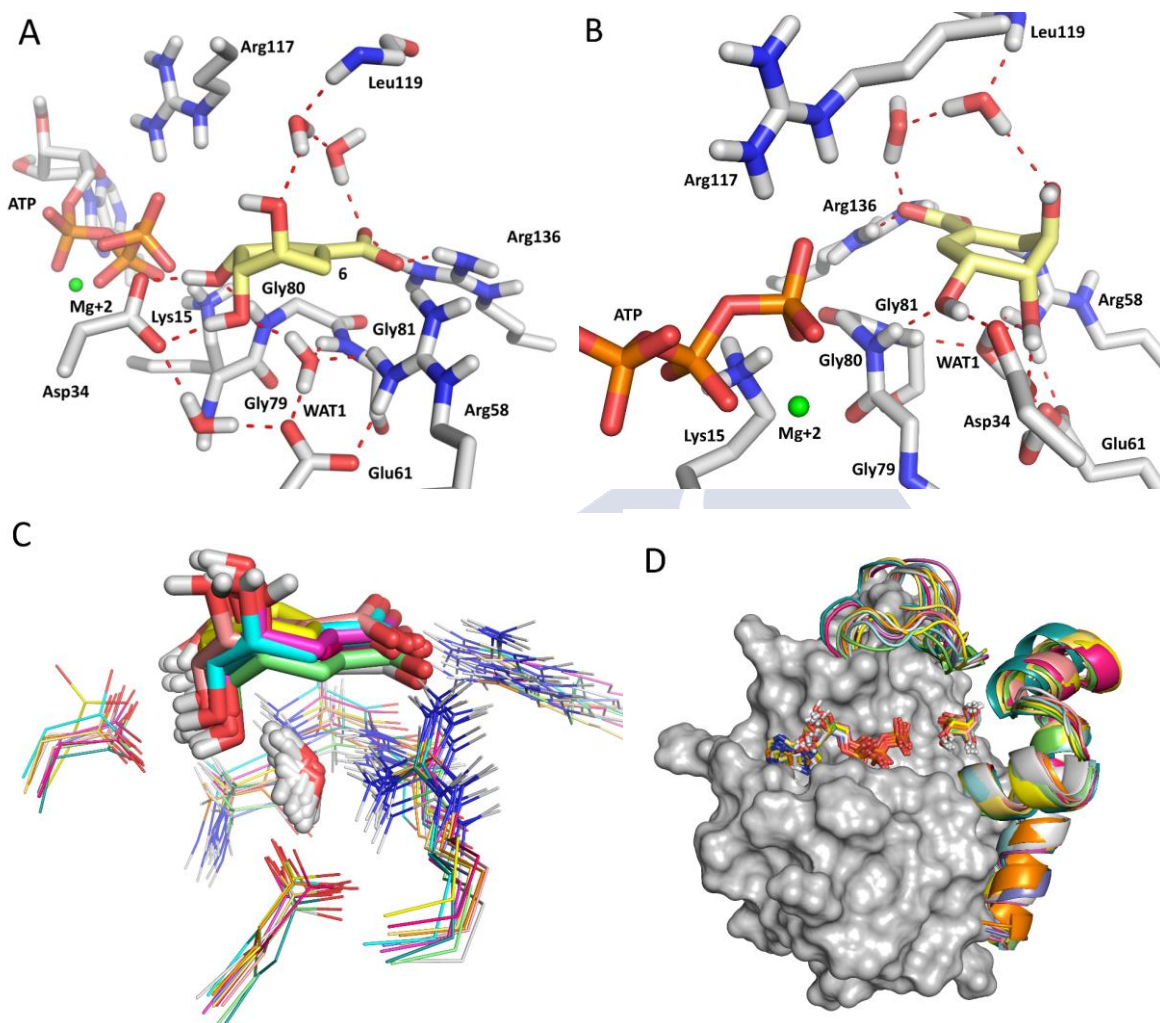


Figura 7. A, B. Perspectivas detalladas de las interacciones más relevantes de la unión del ácido siquímico (**6**) en el centro activo de SQ-Mt. Se muestran y etiquetan los residuos más relevantes. Se muestran los enlaces de hidrógeno como líneas discontinuas rojas. C. Comparación de la posición del agua estructural (WAT1) durante distintas etapas de la simulación. D) Comparación de los dominios LID y SB y de la posición de ambos sustratos (ATP y **6**) en el complejo SQ-Mt/ATP/**6** durante la simulación de dinámica molecular (10 ns).

Por otra parte, la disposición axial del grupo hidroxilo en C5 se logra mediante una red de moléculas de agua, mediante las que interacciona con el carboxilato en C1 y con el grupo NH de la cadena principal de la Leu119 localizada en el LID y que lo mantiene cerrado (Figura 7C). Estas moléculas de agua están siempre localizadas en una región apolar formada por los residuos de Pro11, Leu119 y Leu132, que

favorecen esta disposición, y junto con la Arg117, contribuye a cerrar herméticamente el centro activo. Por último, los estudios realizados mostraron que la posición de ambos sustratos en el centro activo apenas variaba tras 10 ns de simulación (Figura 7D).

Por lo tanto, forzando la disposición axial de los grupos hidroxilos en C4 y C5, el enzima controla la disposición ecuatorial del grupo hidroxilo en C3, y así, logra su fosforilación selectiva. Las interacciones de enlace de hidrógeno con el grupo NH del residuo conservado Gly80, que permanece estable durante la simulación, permite la orientación adecuada de uno de los pares libres del grupo hidroxilo del C3 para la reacción de fosforilación.

1.6 Inhibidores de SQ-Mt – Antecedentes

Se han descrito diversos compuestos con actividad inhibitoria frente a la SQ-Mt, aunque en la mayoría de los casos, o bien no inciden sobre el centro de reconocimiento del ácido siquímico o su mecanismo de acción es incierto (Figura 8).

Mehra y colaboradores⁶⁶ a través de un cribado virtual de entre 2.000 compuestos de una librería química han descubierto dos inhibidores de la SQ-Mt, los compuestos I y II cuyas IC₅₀ son de 10 y 46 µM, respectivamente. El compuesto I, que resultó ser un inhibidor no competitivo con una K_i de 13 µM, se uniría al complejo enzima/producto impidiendo así la liberación del producto.

⁶⁶ Mehra, R.; Rajput, V.-S.; Gupta, M.; Chib, R.; Kumar, A.; Wazir, P.; Ali Khan, I.; Nargotra, A. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 930–940.

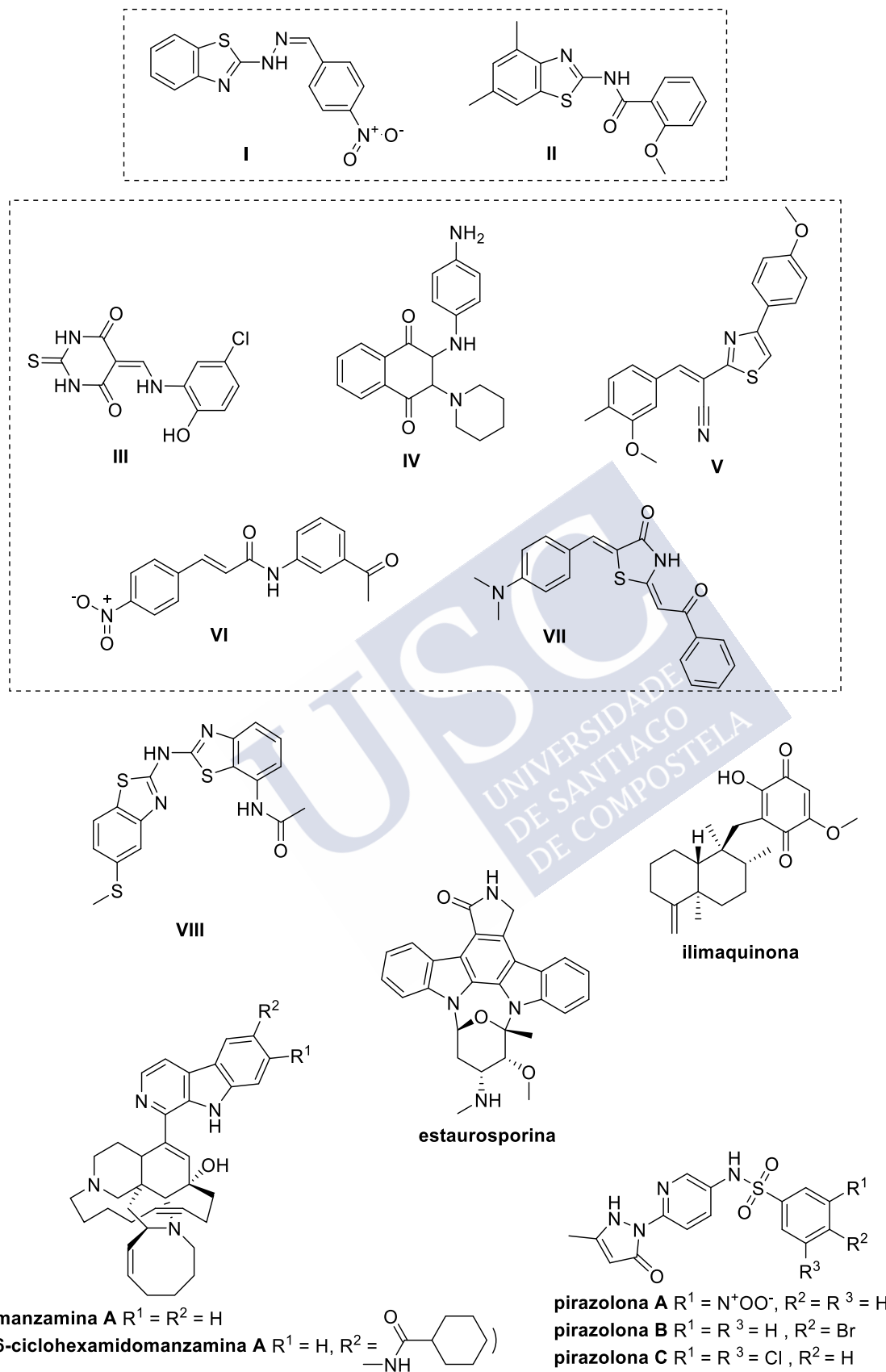


Figura 8. Inhibidores SQ-Mt.

Mediante cribado virtual de una quimioteca de 1000 compuestos con actividad antituberculostática, Rajput y colaboradores⁶⁷ identificaron 20 inhibidores de la SQ-Mt, 5 de ellos, el tiobarbitúrico **III**, la naftoquinona **IV**, el tiazolacetónitrilo **V**, la chalcona **VI** y la tiazolidinediona **VII** con valores de $IC_{50} < 10 \mu M$ (Figura 8). El compuesto más potente resultó ser la naftoquinona **IV** con una K_i de $7.5 \mu M$, siendo un inhibidor competitivo del ATP.

Por otra parte se identificaron además la acetamida **VIII** que demostró tener un IC_{50} de $1.94 \mu M$ y los alcaloides aislados de esponjas marinas, las manzaminas A (Figura 8).^{79,68} La manzamina A demostró una actividad *in vitro* frente a *M. tuberculosis* (CIM = $1.5 \mu g/mL$) comparable a la de la rifampicina (CIM = $0.5 \mu g/mL$).^{69,70} Sin embargo, su uso como fármaco se ve dificultado dada la citotoxicidad mostrada, debido, posiblemente, a que la parte aromática actúa como agente intercalante.⁷¹ La incorporación del grupo amida en su estructura para producir la 6-ciclohexamidomanzamina A eliminó dicha citotoxicidad,⁷² y además mostró una constante de inhibición frente a SQ-Mt de $0.06 \mu M$. Las manzaminas han demostrado ser inhibidores no competitivos, desconociéndose, hasta el momento, su mecanismo de acción.⁷³ Otros compuestos naturales que han demostrado tener actividad inhibitoria frente a la SQ-Mt son la ilimaquinona, un metabolito procedente de la esponja *Hippospongia metachromia*,^{74,75} y la estaurosporina,

⁶⁷ Rajput, V. S.; Mehra, R.; Kumar, S.; Nargotra, A.; Singh, P. P.; Khan, I. A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 5415–5426.

⁶⁸ Simithy, J.; Reeve, N.; Hobrath, J. V.; Reynolds, R. C.; Calderón, A. I. *Tuberculosis.* **2014**, *94*, 152–158.

⁶⁹ Peng, J.; Kudrimoti, S.; Prasanna, S.; Odde, S.; Doerksen, R. J.; Pennaka, H. K.; Choo, Y.-M.; Rao, K. V.; Madgula, V.; Khan, S. I.; Wang, B.; Mayer, A. M. S.; Jacob, M. R.; Hamann, M. T. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 61–76.

⁷⁰ Rao, K. V.; Donia, M. S.; Peng, J.; Garcia-Palomero, E.; Alonso, D.; Martinez, A.; Medina, M.; Franzblau, S. G.; Tekwani, B. L.; Khan, S. I. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1034–1040.

⁷¹ Waters, A. L.; Hill, R. T.; Place, A. R.; Hamann, M. T. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 780–786.

⁷² Wahba, A. E.; Peng, J.; Kudrimoti, S.; Tekwani, B. L.; Hamann, M. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7775–7782.

⁷³ Simithy, J.; Fuanta, N. R.; Alturki, M.; Hobrath, J. V.; Wahba, A. E.; Pina, I.; Rath, J.; Hamann, M. T.; DeRuiter, J.; Goodwin, D. C.; Calderón, A. I. *Biochemistry.* **2018**, *57*, 4923–4933.

⁷⁴ Luibrand, R. T.; Erdman, T. R.; Vollmer, J. J.; Scheuer, P. J.; Finer, J.; Clardy, J. *Tetrahedron.* **1979**, *35*, 609–612.

⁷⁵ Simithy, J.; Fuanta, N. R.; Kochanowska-Karamyan, A.; Hobrath, J. V.; Hamann, M. T.; Goodwin, D. C.; Calderón, A. I. *BBA - Proteins and Proteomics.* **2018**, *5*, 731–739.

aislado de la bacteria *Streptomyces staurosporeus*.⁷⁶ Este último es un inhibidor competitivo del ATP con EC₅₀ para SQ-Mt de 0.03 μM.⁷⁷ Sin embargo, el compuesto demostró ser tóxico.^{78,79}

Por último, se han descrito análogos de pirazolonas que presentan actividad inhibitoria frente a SQ-Mt. Las pirazolonas aquí representadas como A, B y C^{80,81,82,83} presentan valores de IC₅₀ < 1 μM y valores de EC₅₀ de 0.24, 0.07 y 0.18 μM, respectivamente (Figura 8).⁷⁸

En nuestro grupo de investigación se ha trabajado también en la inhibición del enzima siquimato quinasa. Basándonos en estudios de modelado molecular y simulaciones de dinámicas moleculares se diseñaron y sintetizaron análogos del ácido siquímico y miméticos del estado de transición con los que alcanzamos constantes de inhibición del rango del bajo micromolar e incluso del nanomolar. Posteriormente hablaremos de los inhibidores más relevantes desarrollados en nuestro grupo de investigación que han servido como base de diseño de los inhibidores objetivo de esta tesis.

1.7 Estrategias en el Diseño de Inhibidores Basados en la Diana

Las estrategias más utilizadas actualmente en la identificación de ligandos que modulen la actividad de un determinado enzima, se basan, bien en el cribado virtual de ligandos disponibles en bases de datos, o en estudios de modelado molecular (docking). En ambos casos, los estudios requieren el uso de una estructura

⁷⁶ Omura, S.; Iwai, Y.; Hirano, A.; Nakagawa, A.; Awaya, J.; Tsuchiya, H.; Takahashi, Y.; Masuma, R. *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 275–282.

⁷⁷ Tanramluk, D.; Schreyer, A.; Pitt, W.R.; Blundell, T.L. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 16–24.

⁷⁸ Mulabagal, V.; Calderón, A. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3616–3621.

⁷⁹ Gordon, S.; Simithy, J.; Douglas, C. S.; Calderón, A. I. *Perspectives in Med. Chem.* **2015**, *7*, 9–20.

⁸⁰ Bandodkar, B. S.; Schmitt, S. *Pyrazolone derivatives for the treatment of tuberculosis*. Patent, WO/2007/020426 A1, 2007.

⁸¹ Abunada, N.; Hassaneen, H.; Kandile, N.; Miqdad, O. *Molecules.* **2008**, *13*, 1011–1024.

⁸² Castagnolo, D.; Manetti, F.; Radi, M.; Bechi, B.; Pagano, M.; De Logu, A.; Meleddu, R.; Saddi, M.; Botta, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5716–5721.

⁸³ Bandodkar, B. S.; Schmitt, S. *Pyrazoline derivatives for the treatment of tuberculosis*. US Patent App. 12/063,740, 2010.

tridimensional disponible en el “Protein Data Bank (PDB)” o de un modelo de homología validado. Mediante estas aproximaciones se considera el enzima como un molde rígido (modelo llave-cerradura), y se selecciona la región de unión del potencial ligando, que si se quieren desarrollar inhibidores competitivos sería el centro activo. En el caso de un cribado virtual, el estudio nos indicaría qué ligandos de la quimioteca inicial encajarían mejor en esa región y en qué conformación lo harían. Si se trata de modelado molecular, el método priorizaría de entre una colección de ligandos diseñados o escogidos, por ejemplo, miméticos del sustrato natural o del estado de transición, los más óptimos. En ambos casos, los resultados obtenidos de ambas estrategias dependerán en gran medida de la conformación del enzima en la estructura tridimensional escogida en el estudio, al no contemplarse cambios conformacionales en la diana.

Sin embargo, el modelo llave-cerradura no refleja adecuadamente el comportamiento real de un enzima ya que estos no son sistemas rígidos, sino que su conformación se adapta a la del ligando que reconoce y esta cambia durante la catálisis (modelo inducido).⁸⁴ Así, en ausencia de sustrato, los enzimas adoptan normalmente una conformación más o menos abierta para recibir al ligando. Una vez anclado el sustrato en el centro activo, habitualmente el enzima se cierra para arropar al ligando, logrando así un ambiente hidrófobo que potencia, por una parte, la reactividad de los residuos del centro activo, y, de otra, la de ciertos grupos funcionales en el sustrato para que tenga lugar su transformación. Finalmente, se desencadenan cambios conformacionales en el enzima para expulsar el producto del centro activo, y recuperar así la conformación abierta inactiva para empezar de nuevo el siguiente ciclo catalítico.⁸⁵

⁸⁴ Berg, J.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry* (6th Edition). W.H Freeman and Company. New York. **2006**.

⁸⁵ Prado, V.; Lence, E.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 17988–18000.

De cara al diseño de un ligando de una diana terapéutica, el tener en cuenta el movimiento intrínseco de la macromolécula, si bien es una aproximación que proporciona modelos más realistas e información más detallada que el modelado molecular, es una metodología mucho más compleja que las anteriormente mencionadas. Requiere: (a) el uso de super-ordenadores como los disponibles en el Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA), (b) software poco general (Amber, Gromacs, etc.), (c) lenguaje computacional más especializado (Linux), y (d) mucho tiempo de cálculo. Pese a la dificultad que este tipo de aproximación conlleva, en nuestro grupo de investigación estamos convencidos de que estrategias basadas en el movimiento poseen un gran potencial en el descubrimiento e identificación de ligandos con un mecanismo de acción alternativo, ya que los cambios conformacionales que sufre un enzima durante la catálisis es un proceso esencial en sí mismo y permite además utilizar bolsillos en la diana poco visibles en el modelo rígido. Por lo tanto, consideramos que tanto el control de la conformación de la diana, como la del ligando, podría ser una buena aproximación para el diseño de inhibidores enzimáticos. Mediante esta estrategia hemos identificado un inhibidor de la SQ-*Hp* capaz de estabilizar una conformación abierta e inactiva del enzima.^{85,86} Como se comentará en capítulos posteriores, este compuesto es un inhibidor competitivo reversible que posee una K_i de 560 nM y una actividad *in vitro* frente a *H. pylori* de 4 µg/mL (de su proforma). Tomando como base los resultados previos obtenidos en el grupo de investigación que se detallarán más adelante, esta tesis doctoral se centrará en el desarrollo de nuevos inhibidores de la SQ capaces de fijar la conformación del enzima en una disposición inapropiada para la catálisis y/o que evite la regeneración catalítica.

1.8 Cambios Conformacionales de la SQ para la Regeneración Catalítica

En el grupo de investigación se estudió el dinamismo de los enzimas SQ-*Mt* y SQ-*Hp* analizando los cambios conformacionales que necesitan realizar estos enzimas para expulsar el producto del centro activo. Esto se llevó a cabo mediante

simulaciones de dinámica molecular con los correspondientes complejos enzimáticos con los productos de reacción, es decir SQ-Mt/ADP/**7** y SQ-Hp/ADP/**7**.^{60,86}

Los estudios realizados con el enzima SQ-Mt mostraron que inmediatamente al inicio de la simulación (≈ 20 ps), la cadena lateral del residuo de Asp34 se aleja del grupo fosfato en C3 del siquimato-3-fosfato (**7**), y la cadena lateral de la Arg117 situada en el LID, se mueve progresivamente hacia el grupo fosfato en C3 de **7** (≈ 0.8 ns) para formar, mediante su grupo guanidinio, una fuerte interacción electrostática con este (Figura 9). Dicha interacción desencadena la expulsión del producto del centro activo ya que la Arg117 tira del grupo fosfato en **7**, lo que provoca la rotura de las interacciones favorables del producto con los residuos del centro activo, en particular, el puente salino entre el grupo carboxilato en C1 y el grupo guanidinio de la Arg136. Como consecuencia, se produce un gran cambio conformacional en el producto, causando un amplio movimiento en el dominio SB de hasta 10 Å. Dicho movimiento provoca que el producto de la reacción pierda las interacciones que controlan la conformación de alta energía requerida para la catálisis experimentando así, un giro de $\approx 45^\circ$ y un cambio conformacional a la disposición termodinámicamente más estable, es decir, con los grupos hidroxilos de los carbonos C4 y C5 en disposición pseudoecuatorial.

A medida que el producto se aleja del residuo Arg117, los residuos Arg58 y Arg136 se convierten en los responsables de la expulsión del producto del centro activo. Con el producto encaminado hacia fuera del centro activo, el dominio SB recupera su posición inicial, pero en una conformación ligeramente más abierta que después de la unión del sustrato (alejado ≈ 2 Å). Durante la expulsión del producto, el dominio LID también experimenta importantes movimientos que permiten que las cadenas laterales de las Arg117 y Arg136 experimenten un amplio desplazamiento para expulsar al producto fuera del centro activo.

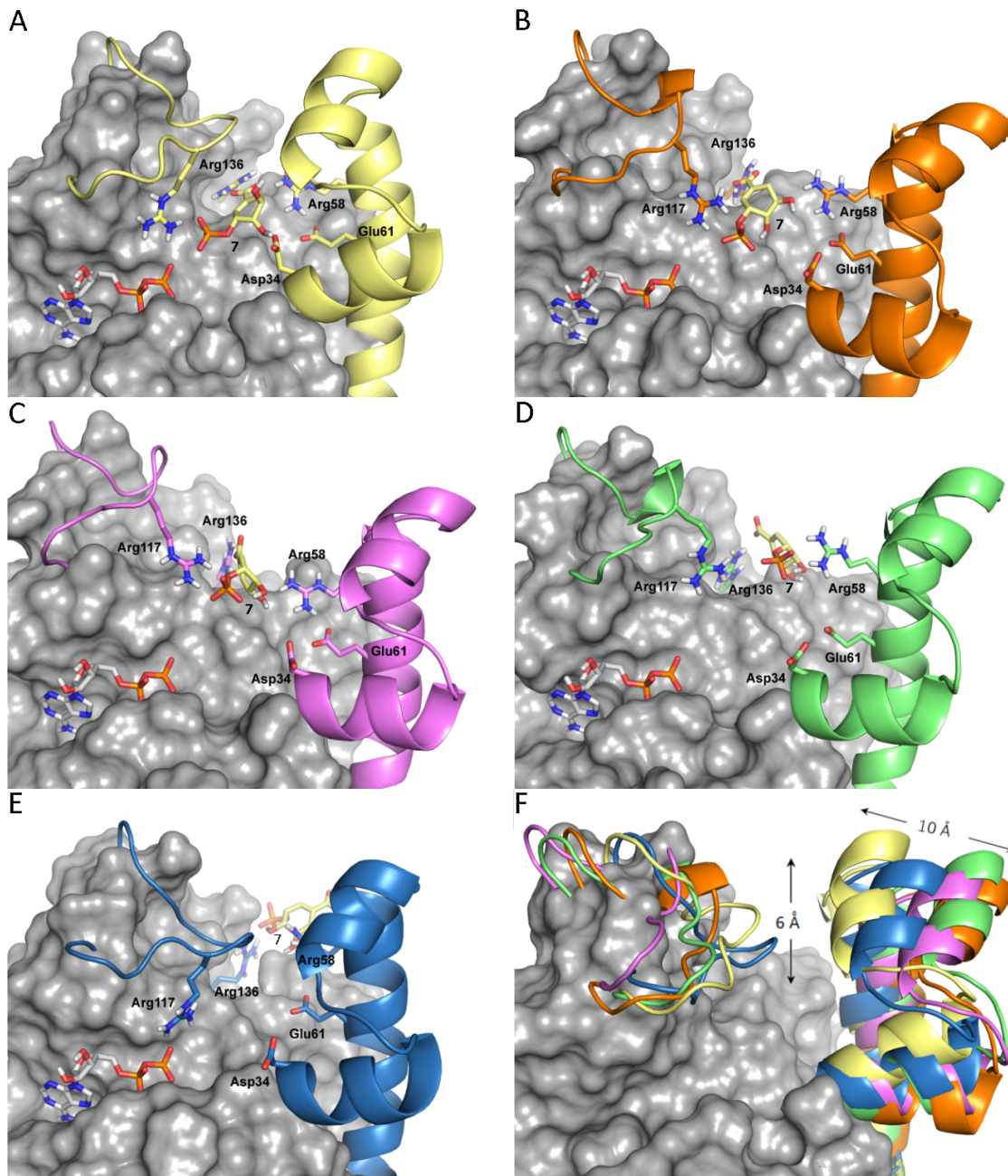


Figura 9. Mecanismo de expulsión del siquimato-3-fosfato (**7**) (amarillo) del centro activo de la SQ-Mt obtenido mediante simulaciones de Dinámica Molecular. Se muestran diferentes instantáneas del proceso: A. después de 0.02 ns (amarillo); B. después de 0.08 ns (naranja); C. después de 0.16 ns (magenta); D. después de 2.4 ns (verde); E. después de 10 ns (azul); F. superposición de A-E. Destaca el gran cambio conformacional que sufren los dominios LID y SB durante la expulsión. No se observaron cambios significativos en el dominio de unión del ADP. Se muestran y se etiquetan las cadenas laterales de los residuos más relevantes.

Además, se observa que las interacciones de enlace de hidrógeno que el enzima utiliza para mantener unidos a los dominios de unión, el del sustrato y el del cofactor, se pierden rápidamente durante la simulación, de modo que la cadena lateral del residuo de Asp32 ahora sólo interacciona con el grupo NH de las cadenas

principales de los residuos de Asp34 y Val35. La apertura de los dominios SB y LID que experimenta la SQ-Mt recuerda al movimiento de un acordeón, lo cual es sorprendente dado que el dominio SB se compone de tres hélices: $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$.

El estudio del comportamiento dinámico del complejo SQ-Hp/ADP/**7** reveló diferencias significativas entre los dos enzimas (Figura 10).⁸⁶

Si bien en ambos casos se produce una amplia apertura del dominio LID de aproximadamente 10 Å, y las tres argininas conservadas son responsables de eliminar el producto del centro activo a través de fuertes interacciones electrostáticas entre sus grupos guanidinio y el grupo fosfato en **7**, la expulsión del producto del centro activo es un proceso mucho más lento para el enzima SQ-Hp que para el enzima proveniente de *M. tuberculosis* y el movimiento del dominio SB es marcadamente distinto en ambas macromoléculas.⁶¹ Mientras que para el enzima SQ-Mt se observa una apertura síncrona y grande (Figura 10A) para el enzima SQ-Hp se observó una apertura asíncrona y más reducida (Figura 10B), centrándose los principales cambios conformacionales en las hélices $\alpha 5$ (≈ 4 Å) y $\alpha 3$ (≈ 3 Å), siendo menos pronunciados que en el enzima de *M. tuberculosis* (Figura 10E–F). Se observó una apertura de tan solo 2 Å para la hélice $\alpha 2$.

En conclusión, los estudios de simulación de DM permiten definir cuatro factores estructurales fundamentales necesarios en la catálisis de la SQ:

1. La fijación de los grupos hidroxilos en C4/C5 del ácido siquímico (**6**) en una disposición diaxial.
2. La disposición cerrada del LID para la activación del grupo γ -fosfato del ATP mediante interacción electrostática con el grupo guanidinio de la Arg116/Arg117 (*H. pylori* y *M. tuberculosis*, respectivamente).

⁸⁶ Prado, V.; Lence, E.; Maneiro, M.; Vázquez-Ucha, J. C.; Beceiro, A.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. J. *Med. Chem.* **2016**, *59*, 5471–5487.

3. La disposición cerrada del dominio SB, que permite acercar ambos sustratos para que tenga lugar la transferencia del grupo fosfato y al mismo tiempo aislar el sustrato del disolvente mediante la formación de una cavidad apolar.
4. La flexibilidad de los dominios LID y SB para la expulsión del producto y la regeneración catalítica.

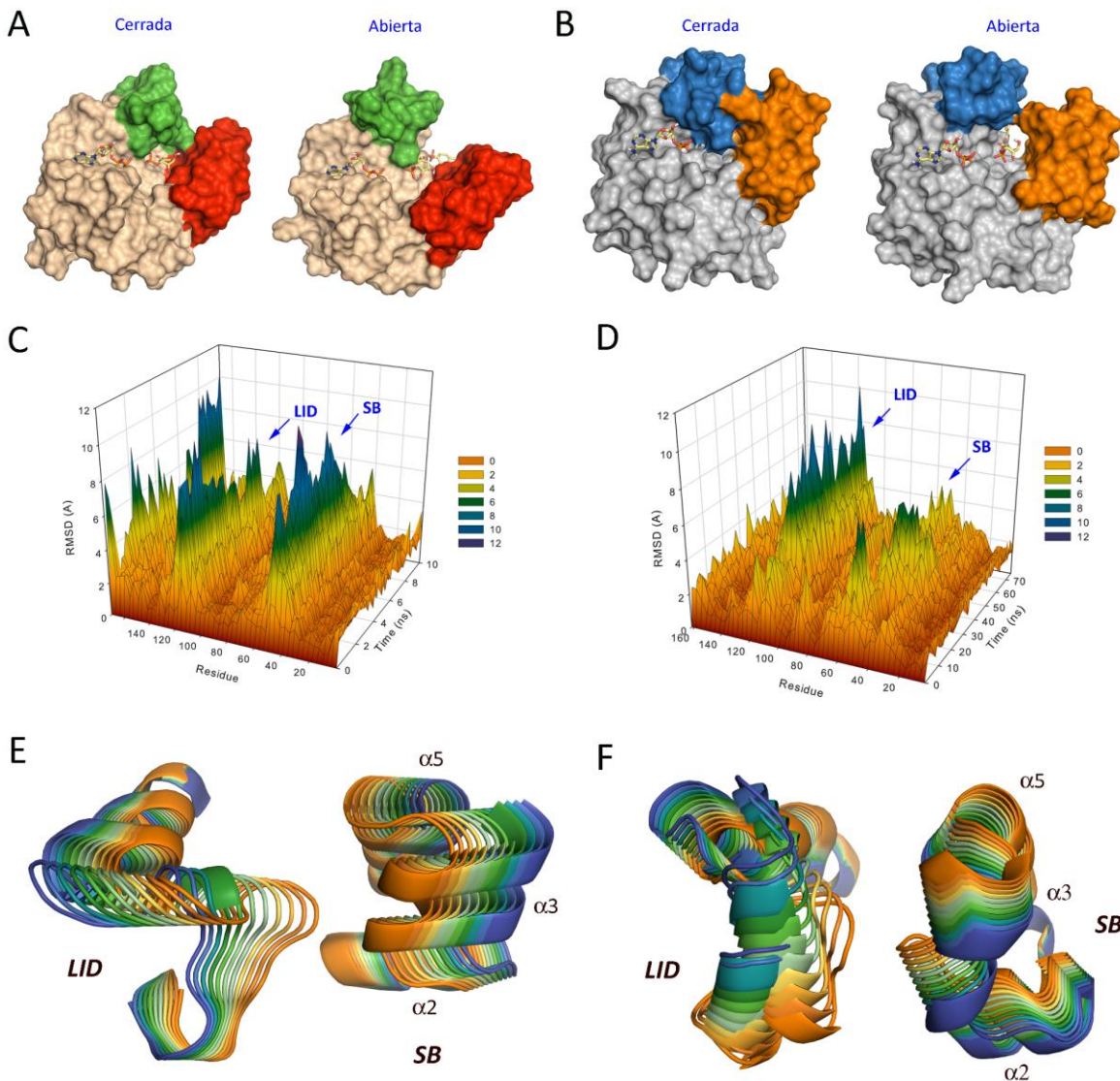


Figura 10. A, B. Visión general del movimiento de la SQ-Mt (A) y la SQ-Hp (B) para la liberación del producto del centro activo obtenido mediante estudios de simulación. Se muestra la posición del siquimato-3-fosfato (**7**) al principio y al final de la simulación. Se destacan los dominios LID y SB de SQ-Mt (A, verde y rojo, respectivamente) y SQ-Hp (B, azul y naranja, respectivamente). C, D. Variación (RMSD) del esqueleto de la proteína calculada por residuo y del siquimato-3-fosfato (**7**) en los complejos SQ-Mt/ADP/**7** (A) y SQ-Hp/ADP/**7** (B). Se analizaron los átomos de C α , C, N, y O en la proteína, y los átomos de C, P y O en el producto. E, F. Vista general del movimiento de SQ-Mt (C) y SQ-Hp (D) obtenido mediante examen de los modos vibracionales.



Capítulo 2. Objetivos



2.1 Objetivos

En esta tesis doctoral se plantea como objetivo general, el desarrollo de nuevos antibióticos cuyo modo de acción se base en la inhibición selectiva y eficaz del quinto enzima de la ruta del ácido siquímico, la siquimato quinasa, que es esencial, entre otras, en las bacterias patógenas *Mycobacterium tuberculosis* y *Helicobacter pylori*. Esto se propone llevar a cabo mediante los siguientes objetivos concretos:

Objetivo 1: Diseño, síntesis y evaluación biológica de miméticos de la conformación de alta energía del ácido siquímico (**6**) que reconoce el enzima, mediante la incorporación de restricciones conformacionales en **6** que fijen su estructura. Con este fin se propone la síntesis de los compuestos **10–13** que fijan la conformación diaxial de las posiciones C4 y C5 mediante diversos tipos de unión covalente entre las posiciones C3 y C5 en **6**: (i) los análogos **10** que poseen un puente tipo éter; (ii) los análogos **11–12** que poseen un puente carbonado; y (iii) los compuestos **13** que disponen de una conexión tipo amino o amida (Figura 11). Los compuestos incorporarían diversos grupos apolares en el puente mediante los cuales se pretende potenciar interacciones lipofílicas favorables entre el ligando y los residuos del centro activo. Con ello se busca provocar la reducción de la flexibilidad del LID y/o del dominio SB, estabilizando una conformación cerrada del centro activo.

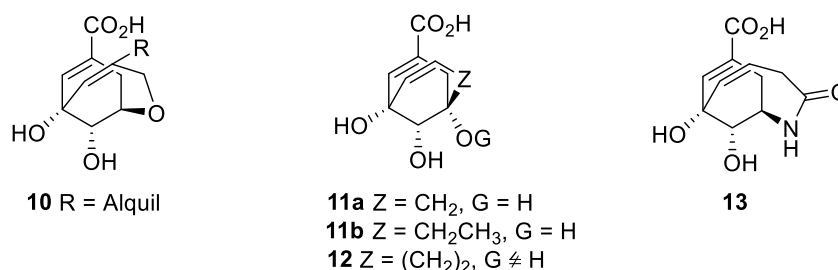


Figura 11

Objetivo 2: Diseño, síntesis y evaluación biológica de análogos del ácido siquímico (**6**) capaces de estabilizar conformaciones inactivas y/o de reducir la flexibilidad intrínseca de la SQ. Esta hipótesis se explorará con tres tipos de ligandos:

2.1 Los compuestos **14–16** que presentan un grupo aminoalquilaril o alquiloaril en la posición C3 del ácido siquímico (**6**) con el objeto de favorecer interacciones extra con la interfase que separa los dos centros de reconocimiento de la SQ, el del ATP y del ácido siquímico (**6**) (Figura 12).

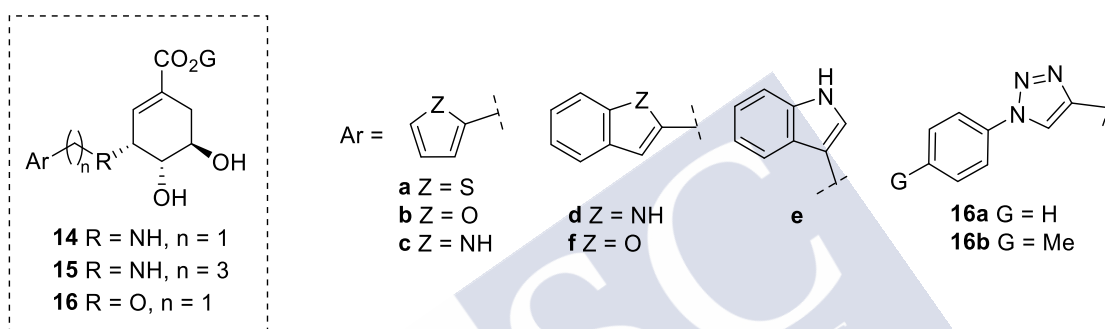


Figura 12

2.2 Los compuestos **17** que incorporan en la posición C5 del ácido siquímico (**6**) una amina terciaria funcionalizada con un grupo etilo y bencílico con el fin de favorecer contactos apolares con los residuos del dominio SB (Figura 13).

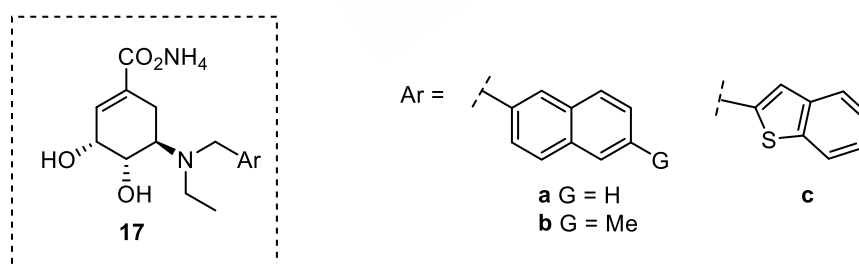


Figura 13

2.3 Los compuestos **18–20** funcionalizados en la posición C4 con los que se pretende producir cambios conformacionales en el dominio SB del enzima SQ-Mt (Figura 14).

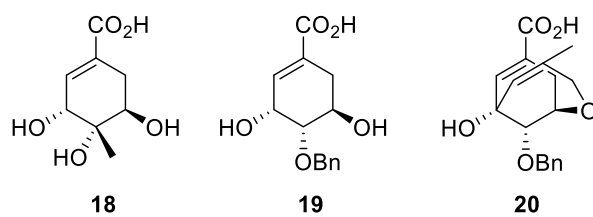


Figura 14







**Capítulo 3. Miméticos Estables de la Conformación de Alta Energía del
Sustrato Natural**



3.1 Planteamiento y Antecedentes

Cuando un ligando se une a su objetivo biológico adopta una conformación que le permita maximizar las interacciones favorables con los residuos presentes en el bolsillo de unión, por lo que su conformación activa puede ser significativamente diferente a la adoptada en disolución, pudiendo en ciertos casos alcanzar conformaciones activas de alta energía.⁸⁷ Debido a ello, los ligandos flexibles pueden sufrir una penalización entrópica al alcanzar su conformación activa que puede repercutir negativamente en su afinidad por la diana. De ahí que la restricción conformacional de un ligando flexible en la conformación activa, podría mejorar su afinidad por el enzima así como incrementar su especificidad.^{88,89,90}

Esta estrategia ha sido llevada a cabo en numerosas ocasiones para el tratamiento de diferentes enfermedades. Entre otras, la investigación para el tratamiento de alzheimer ha hecho uso del diseño racional de análogos de conformación restringida para inhibir la acetilcolinesterasa, enzima involucrada en esta enfermedad. En el año 2000 se aprobó la Rivastigmina para el tratamiento del alzheimer por su poder inhibitorio frente a la acetilcolinesterasa y, poco tiempo después, Bolognesi⁹¹ y colaboradores desarrollaron un derivado de esta molécula restringido conformacionalmente cuyo poder inhibitorio resultó 192 veces mejorado con respecto a la Rivastigmina (Figura 15).

El estudio para el tratamiento del VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) que, en algunos casos, se ha enfocado en el diseño de antagonistas del receptor quimiocina ha hecho uso del potencial que posee el diseño de moléculas de

⁸⁷ Sitzmann, M.; Weidlich, I. E.; Filippov, I. V.; Liao, C.; Peach, M. L.; Ihlenfeldt, W.-D.; Karki, R. G.; Borodina, Y. V.; Cachau, R. E.; Nicklaus, M. C. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 739–756.

⁸⁸ Chang, C. E.; Chen, W.; Gilson, M. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 1534–1539.

⁸⁹ Hao, M. H.; Haq, O.; Muegge, I. J. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 2242–2252.

⁹⁰ Fang, Z.; Song, Y.; Zhan, P.; Zhang, Q.; Liu, X. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 885–901.

⁹¹ Bolognesi, M.L.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Andrisano, V.; Rosini, M.; Minarini, A.; Melchiorre, C. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5945–5952.

conformación restringida para la obtención exitosa del fármaco Maraviroc (Figura 15).⁹²

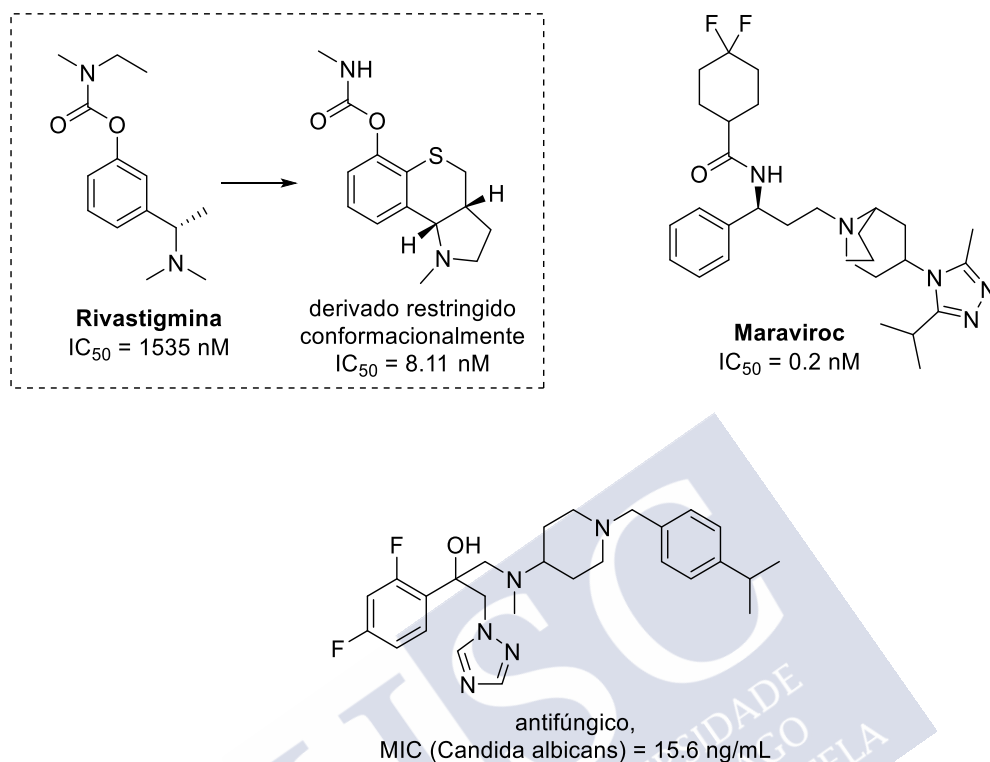


Figura 15

El fluconazol es un fármaco ampliamente utilizado hoy en día cuya capacidad antifúngica se ha visto superada frente al hongo *Candida albicans* por un derivado de triazol de conformación rígida (Figura 15).⁹³ Estos ejemplos son solo unos pocos casos en los que se evidencia el potencial del desarrollo de análogos de conformación restringida, pero el éxito de esta estrategia ha sido demostrado en el tratamiento de numerosas enfermedades, ya sea en el diseño de agentes anticancerígenos, inhibidores del virus de la hepatitis C, etc.⁹⁰

Basándonos en esta idea, en esta tesis doctoral se ha empleado esta estrategia para el desarrollo de inhibidores del enzima SQ. Es importante destacar que el

⁹² Barber, C. G.; Blakemore, D. C.; Chiva, J. Y.; Eastwood, R. L.; Middleton, D. S.; Paradowski, K. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1499–1503.

⁹³ Wang, W.; Wang, S.; Liu, Y.; Dong, G.; Cao, Y.; Miao, Z.; Yao, J.; Zhang, W.; Sheng, C. *Eur. J. Med. Chem.* **45**(12), 6020–6026 (2010).

conocimiento de las interacciones entre el ligando y el enzima, las características del centro activo y la geometría necesaria para la catálisis, es la base para el diseño de compuestos restringidos conformacionalmente con alta capacidad inhibitoria.

Sobre la base de los requisitos estructurales para la catálisis anteriormente mencionados en la introducción, en el grupo de investigación se desarrolló el análogo estable de la conformación de alta energía del sustrato natural, el biciclo **21**, que demostró ser un inhibidor reversible competitivo de la SQ-Mt con una constante de inhibición (K_i) de 62 μM , inferior a la constante de Michaelis del enzima ($K_m = 544 \mu\text{M}$) (Figura 16).⁶⁰

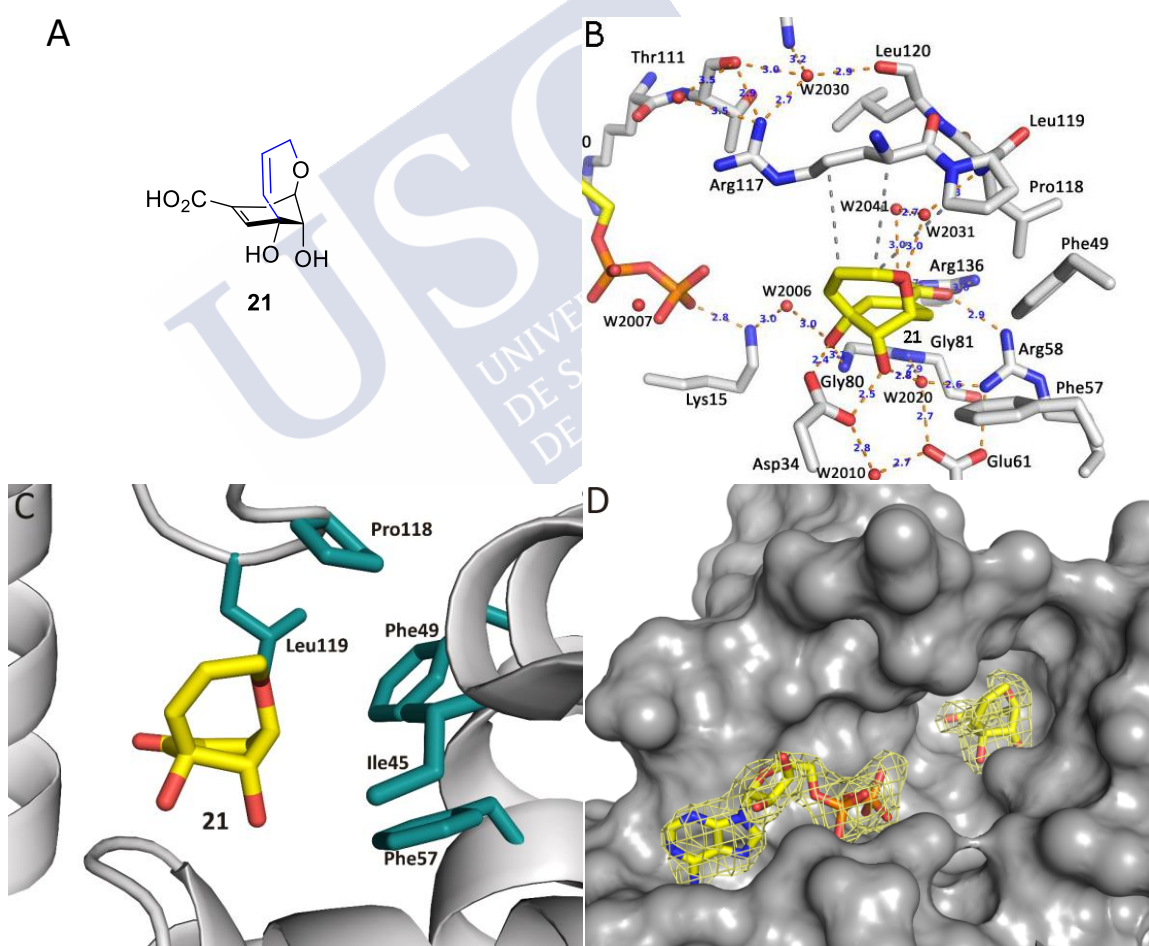


Figura 16. Inhibidor reversible competitivo de la SQ-Mt (**21**). B, C. Estructura cristalina del complejo ternario SQ-Mt/ADP/**21** (PDB 4BQS, 2.15 Å). Se muestran las interacciones más relevantes del compuesto **21** con los residuos del centro activo más relevantes. Se destacan como líneas discontinuas las interacciones de enlace de hidrógeno (naranja), las electrostáticas (naranja) y las apolares (gris). D. Mapa de densidades electrónicas para el inhibidor **21** y el ADP unidos a la SQ-Mt

La resolución de la estructura cristalográfica de la SQ-Mt con ADP y el biciclo **21** en el centro activo (PDB 4BQS, 2.15 Å) demostró que el inhibidor **21** ocupa aproximadamente el mismo sitio y tiene interacciones polares similares a las del sustrato natural (Figura 16).⁶⁰ Pero lo más importante, la estructura demuestra que el inhibidor **21** proporciona una forma muy cerrada y estable del centro activo que previene la apertura del dominio LID, gracias, entre otras, a las favorables interacciones apolares entre el puente éter y la cadena carbonada lateral de la arginina esencial, así como de otros residuos apolares del LID.

En base a estos resultados, en esta tesis doctoral nos propusimos la posible mejora de la eficacia inhibitoria del compuesto **21**, mediante la introducción en el puente éter de **21** de grupos funcionales capaces de potenciar interacciones lipofílicas favorables entre el ligando y el LID (Figura 17).

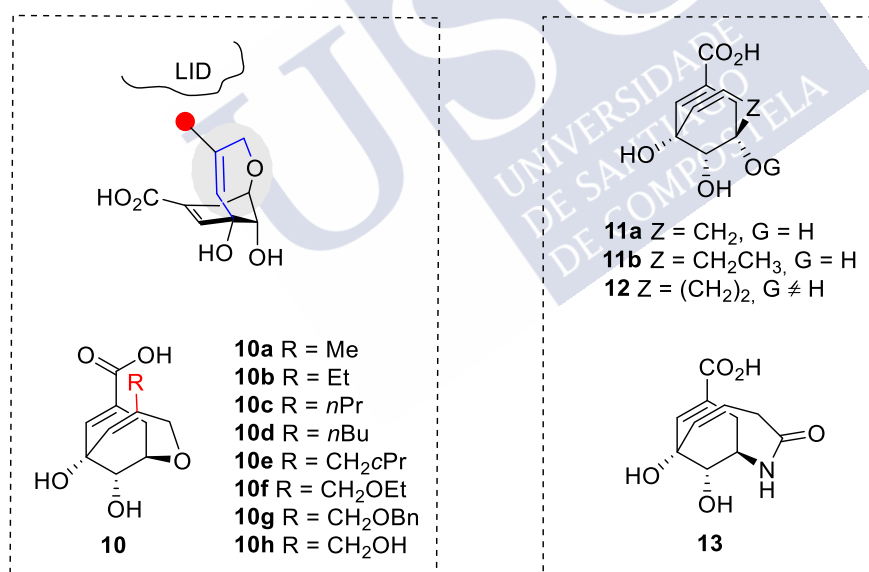


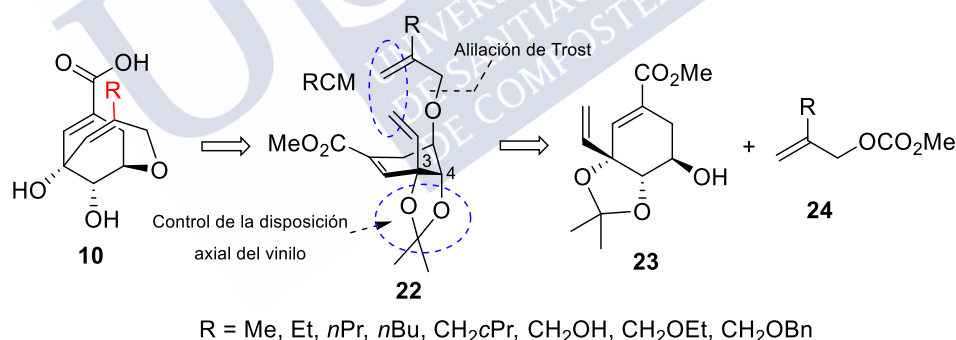
Figura 17. Compuestos objetivo **10–13**.

Con este fin, se llevó a cabo la síntesis de los derivados del ácido siquímico de conformación rígida **10**, en los que el carbono sp² del puente insaturado en **21** más cercano al LID se sustituyó con diversos grupos apolares, lo que permitiría preorientar su interacción con esta parte importante de la enzima. Se estudió además la rigidificación del sustrato natural mediante otro tipo de conexiones entre

las posiciones C3 y C5 del mismo, los compuestos **11–13**, que permitirían incorporar otros grupos funcionales en el biciclo con el objetivo de incrementar las interacciones apolares de la posición 4 del biciclo con los residuos conservados Phe49, Phe57 y Ile36 (para SQ-Mt) localizados en el dominio SB.

3.2 Síntesis de los Compuestos 10

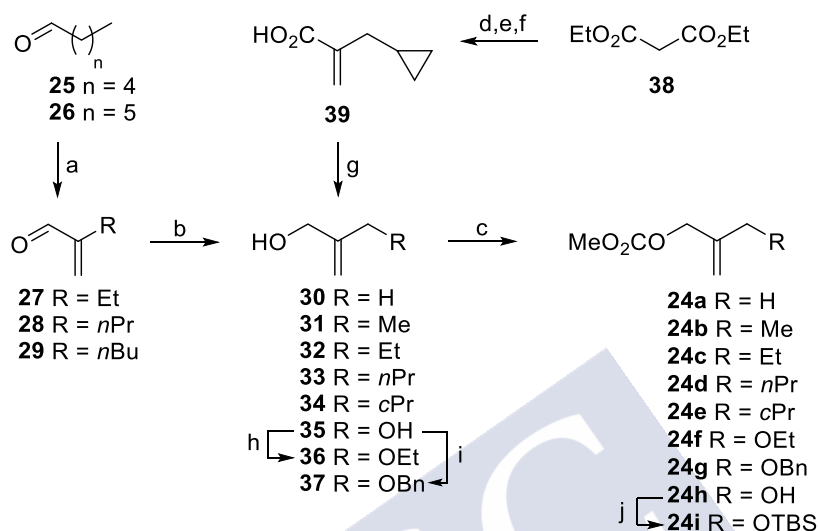
La estrategia propuesta para la síntesis de los derivados del ácido siquímico con conformación restringida **10** implicó en la etapa clave una reacción de metátesis de cierre de anillo (ring-closing metathesis) de los aliloxi vinil derivados **22** (Esquema 4). Para facilitar la formación del anillo de siete miembros en la ciclación de **22**, se indujo la disposición axial del grupo vinilo en C3 mediante la protección de los grupos hidroxilos en C3 y C4 como un acetal. Los compuestos **22** se sintetizaron mediante una reacción de alilación de Trost a partir del alcohol **23**,⁶⁰ previamente descrito en el grupo, usando los alil carbonatos **24**.



Esquema 4. Aproximación sintética para los biciclos **10**.

Los alil carbonatos **24** se prepararon por tratamiento de los alcoholes correspondientes **30–37** con cloroformiato de metilo y piridina (Esquema 5). Los alcoholes **31–33** se sintetizaron por reducción-1,2 de los aldehídos α,β -insaturados **27** (comercial) y **28–29**, estos últimos preparados a partir de pentanal y hexanal, respectivamente. El alcohol **34** se obtuvo en cuatro etapas a partir de malonato de etilo (**38**), que consistieron en: (i) alquilación de **38** con bromuro de ciclopropilmetilo; (ii) hidrólisis descarboxilativa; (iii) condensación aldólica; y (iv)

reducción 1,2 del ácido α,β -insaturado **39**. Los alcoholes **36–37** se prepararon por alquilación del producto comercial 2-metil-eno-1,3-propanodiol (**35**). Finalmente, el carbonato **24i** se obtuvo por protección con TBS del carbonato **24h**.

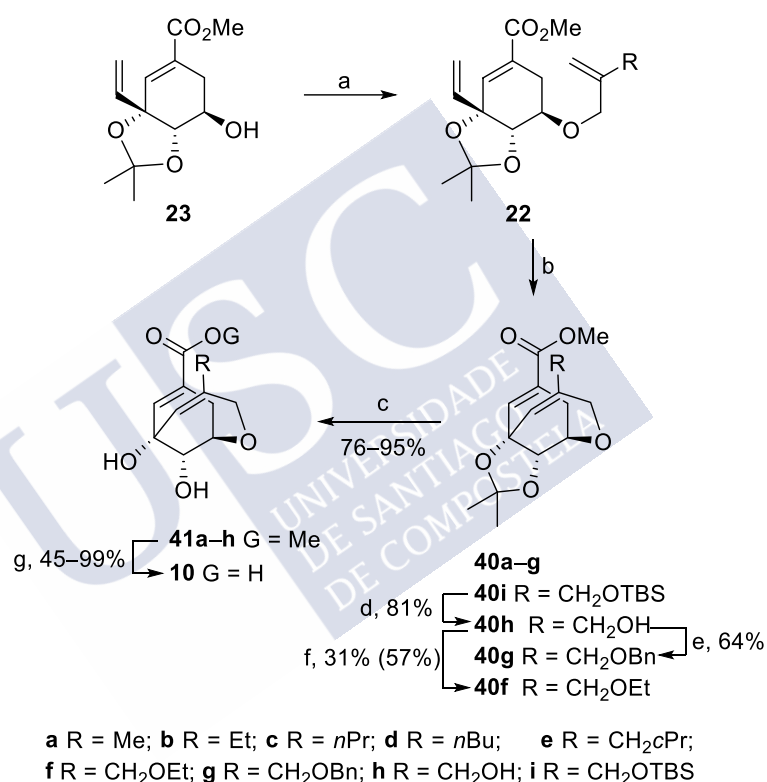


Esquema 5. Síntesis de los carbonatos **24**. *Reactivos y condiciones:* (a) HCHO, pirrolidina, ácido propiónico, *i*PrOH, 45 °C. (b) NaBH₄, MeOH, Et₂O, 0 °C a t.a. (c) MeOCOCi, Pi, CH₂Cl₂, 0 °C a t.a. (d) 1. NaH, THF, 0 °C; 2. BrCH₂cPr, Δ . (e) NaOH (2 M), Δ . (f) piperidina, HCHO, EtOH, 80 °C. (g) BH₃·Me₂S, THF, 0 °C a t.a. (h) 1. NaH, DMF, 0 °C; 2. EtBr, t.a. (i) 1. NaH, THF, 0 °C; 2. BnBr, t.a. (j) TBSCl, DMAP, TBAI, Et₃N, DMF, 0 °C a t.a.

La alilación de Trost de **23** catalizada por paladio con los alil carbonatos **24a–g** y **24i** proporcionaron los intermedios clave de la síntesis **22a–g** y **22i** con rendimientos entre el 32% y el 88% (Esquema 6). La metátesis de cierre de anillo de los compuestos **22a–g** y **22i** se llevó a cabo mediante el uso del catalizador de Grubbs de segunda generación en tolueno a 90 °C lo que proporcionó los derivados bicíclicos **40a–g** y **40i** con rendimientos del 16–63%, y del 42–99% si se tiene en cuenta la sustancia de partida recuperada. El derivado bicíclico **40h** se preparó por desprotección por tratamiento con TBAF de **40i**.

Como era de esperar, la reacción de metátesis demostró ser sensible a la substitución en la parte alílica; cuando $R = H$ la reacción transcurre a temperatura ambiente en un rendimiento del 88% mientras que a medida que aumenta el tamaño del sustituyente los rendimientos bajan y requieren una mayor

temperatura. Los peores rendimientos se obtuvieron con los derivados **40g** y **40f**, los cuales contienen un grupo CH_2OBn y CH_2OEt , respectivamente. Estos compuestos se prepararon, alternativamente, mediante alquilación del alcohol **40h** con un rendimiento del 64% y 31% (57%), respectivamente. Finalmente, la desprotección del grupo acetal en **40**, seguido de hidrólisis básica de los ésteres **41a–h** resultantes y posterior protonación con la resina de intercambio iónico Amberlita IR-120 (H^+) proporcionó los compuestos objetivo **10**.

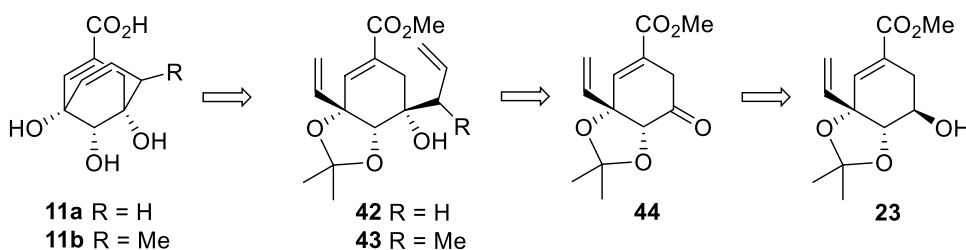


Esquema 6. Síntesis de los biciclos **10**. *Reactivos y condiciones:* (a) **24a–g** y **24i**, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (cat.), dppb, THF, Δ . (b) catalizador de Grubbs 2ª generación, PhMe, 90 °C. (c) MeOH, HCl (6 M), 60 °C. (d) TBAF, THF, 0 °C. (e) 1. NaH, THF, 0 °C; 2. BnBr, t.a. (f) 1. NaH, DMF, 0 °C; 2. EtBr, t.a. (g) 1. LiOH (ac.), THF, t.a. 2. Amberlita IR-120 (H^+), t.a.

3.3 Intentos de Síntesis de los Compuestos **11**

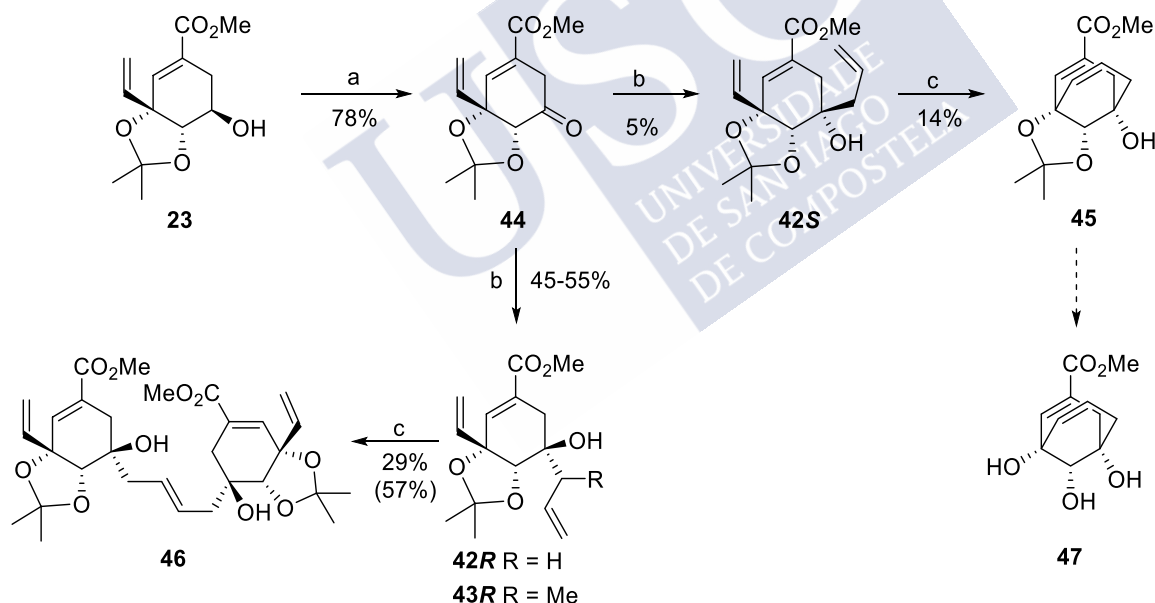
Para la obtención de los biciclos **11** se planteó una estrategia sintética similar a la utilizada en la preparación de los compuestos **10** mediante una reacción de metátesis de cierre de anillo de los compuestos **42** y **43**. Estos últimos se obtendrían

mediante reacciones de adición nucleófila utilizando la cetona **44**, obtenida por oxidación del alcohol **23** (Esquema 7).



Esquema 7. Aproximación sintética para los biciclos **11**.

Así, la oxidación con periodiniano de Dess-Martin del alcohol **23**⁶⁰ proporcionó la cetona **44**, cuyo tratamiento con los organozinc derivados del bromuro de alilo o el bromuro de metilalilo obtenidos por tratamiento con Zn dust produjo una mezcla de los dos posibles diastereoisómeros **42** (Esquema 8).



Esquema 8. Síntesis de los biciclos **11**. *Reactivos y condiciones:* (a) Dess Martin, CH_2Cl_2 , t.a. (b) Zn dust, RalilBr, THF, 0°C a t.a. (c) catalizador de Grubbs-Hoveyda 2ª generación, PhMe, 90°C .

Desafortunadamente, el diastereoisómero mayoritario resultó ser el isómero *R* [55 y 45% para *R* = H y *R* = Me (mezcla de diastereoisómeros en la cadena de alquenilo), respectivamente], obteniéndose solamente un 5% del isómero deseado *S* en el caso de *R* = H, mientras que para *R* = Me no se observó su formación. En un principio, los datos espectroscópicos y experimentos NOE realizados con ambos

isómeros **42S** y **42R** no fueron concluyentes para lograr su correcta elucidación. Esta se logró mediante tapa en la estrategia sintética planteada. Así la reacción de metátesis del compuesto **42S** proporcionó el bicíclico deseado **45** con un rendimiento del 14%, mientras que, en las mismas condiciones, el compuesto **42R** condujo a la obtención del homodímero **46** con un rendimiento del 29% (rendimiento corregido 57%). Así mismo, no se observó reacción con el compuesto **46R**, recuperándose en todos los ensayos la sustancia de partida.

La geometría de la cetona **44** se minimizó usando el Hamiltoniano AM1 implementado en el programa Gaussian 09 (Figura 18). A la vista de los resultados todo parece indicar que el grupo vinilo de C3 bloquea la cara *Si* induciendo que el ataque nucleófilo se produzca fundamentalmente por la cara *Re*. Es importante destacar que esto no se produce con la cetona que carece del grupo vinilo previamente descrita. Así por ejemplo su reducción con NaBH₄ proporciona exclusivamente el alcohol de configuración *S* con un rendimiento del 75%.⁹⁴

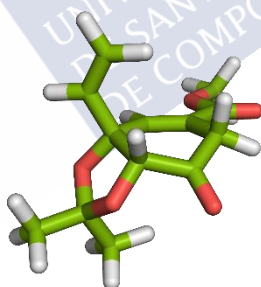
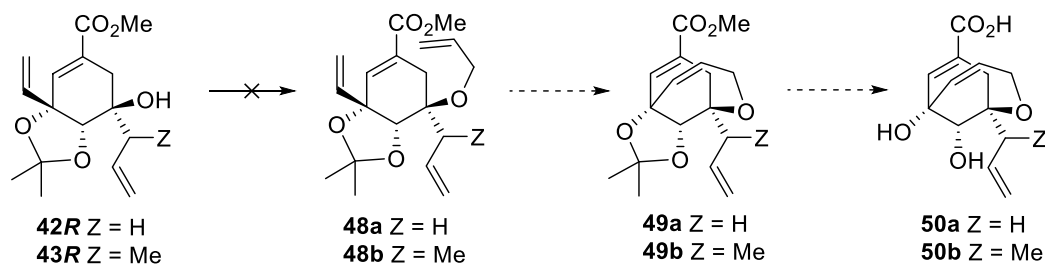


Figura 18. Conformación de mínima energía de la Cetona **34** obtenida mediante cálculos computacionales utilizando el programa Gaussian 09.

Los bajos rendimientos obtenidos en la preparación del compuesto intermedio **42S** y del biciclo **45**, así como la falta de tiempo, dificultaron la conversión final del biciclo **47** en el compuesto objetivo **11** para su posterior evaluación enzimática. La estrategia empleada resulta además poco eficaz por la misma razón, pero pese a ello los compuestos obtenidos **42R** y **43R** nos parecieron interesantes para abordar

⁹⁴ Mohanrao, R.; Asokan, A.; Sureshan, K. M. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 6707–6710.

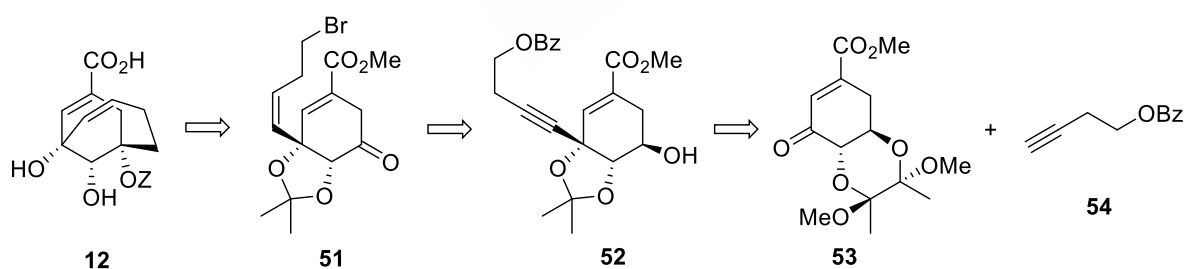
la síntesis de biclos funcionalizados en el carbono puente. Esto implicaría la alquilación con un derivado alílico de los alcoholes terciarios **42R** y **43R** y posterior reacción de metátesis de cierre de anillo (Esquema 9). Desafortunadamente, todos los intentos de alilación realizados fueron negativos.



Esquema 9. Aproximación sintética para los biclos **50**.

3.4 Intentos de Síntesis de los Compuestos **12**

Teniendo en cuenta los resultados antes comentados con la cetona **44**, que revelan que las reacciones de adición nucleófila se producen preferentemente por la cara contraria a la del grupo vinilo, nos planteamos explorar una estrategia alternativa para la síntesis de análogos del ácido siquímico de conformación restringida en los que fuese posible la funcionalización posterior del carbono puente del biclo, los compuestos **12** (Esquema 10).

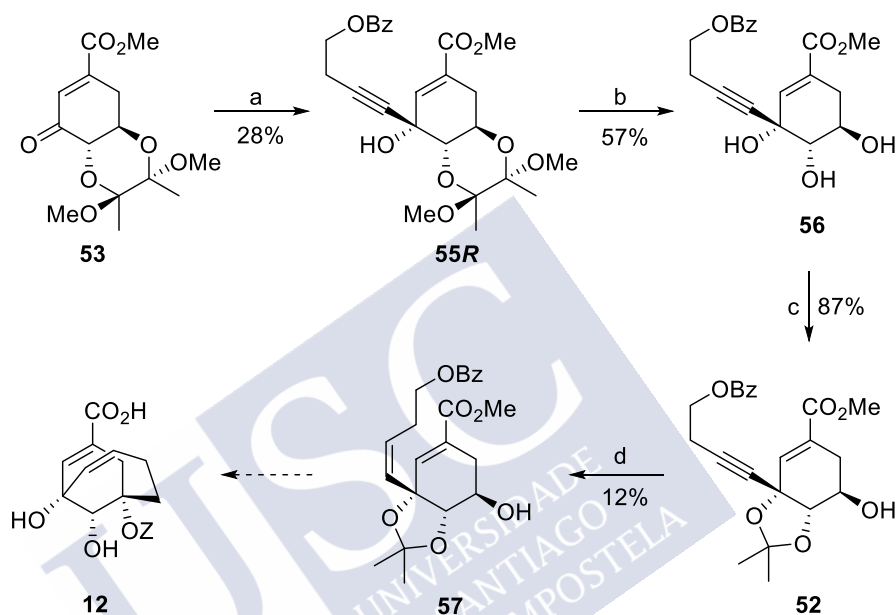


Esquema 10. Aproximación sintética para los biclos **12**.

Esta consistiría en utilizar la disposición axial del grupo vinilo en **51** para producir la adición nucleófila intramolecular sobre la posición C5 mediante la generación de un carbanión en la posición C3. El compuesto clave de la síntesis, el bromuro **51**, se

obtendría a partir del alquino **52**, obtenido por adición-1,2 del alquino **54** a la cetona **53**,⁹⁵ previamente descrita.

La adición nucleófila del organólítico derivado del alquino **54**,⁹⁶ obtenido por tratamiento con LiHMDS, a la cetona **53**⁹⁵ proporcionó los diastereoisómeros **55R** y **55S**, con rendimientos del 28% y 4%, respectivamente (Esquema 11).



Esquema 11. Reactivos y condiciones: (a) **54**, LiHMDS, THF, -78 °C a t.a. (b) TFA/H₂O (20:1), 0 °C. (c) 2,2-DMP, CSA, acetona, Δ. (d) Pd₂(dba)₃, dppb, HCO₂H, dioxano, 80 °C.

La desprotección en medio ácido del grupo bisacetal en **55R** y posterior protección del *cis*-1,2-diol en **56** condujo al acetal **52** con un rendimiento del 86%. En un primer intento de reducción parcial del alquino al alqueno de configuración Z requerido utilizando el catalizador de Lindlar bajo atmósfera de hidrógeno, no resultó satisfactorio al recuperarse la sustancia de partida en todas las ocasiones. Finalmente, el alqueno **57** se obtuvo mediante el tratamiento del alquino **52** con Pd₂(dba)₃ y dppb en presencia de ácido fórmico. Desafortunadamente, la falta de

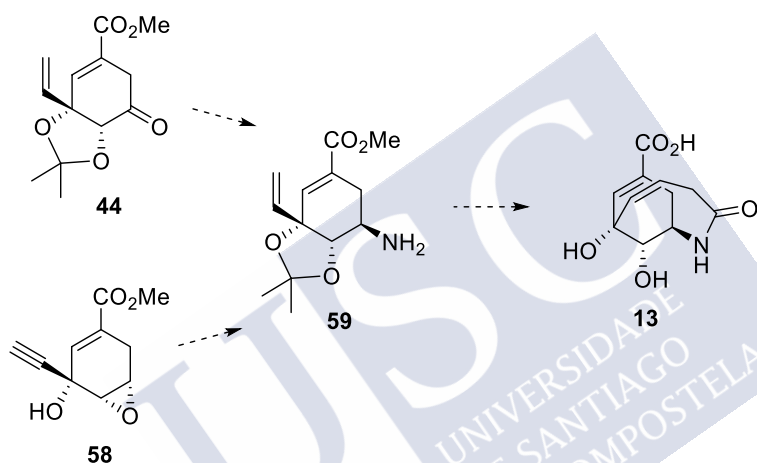
⁹⁵ Alves, C.; Barros, M. T.; Maycock, C. D.; Ventura, M. R. *Tetrahedron*. **1999**, *55*, 8443–8456.

⁹⁶ Tiecco, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *16*, 3447–3458.

tiempo impidió completar la ruta sintética diseñada para lograr la síntesis de los biciclos objetivo **12** y evaluar su poder inhibitorio.

3.5 Intentos de Síntesis del Compuesto **13**

La estrategia sintética para la síntesis del compuesto **13** implicaría en la etapa clave una reacción de metátesis de cierre de anillo y requeriría la preparación de la amina **59** que se abordó mediante dos estrategias sintéticas, I y II, a partir de la cetona **44** y el epóxido **58** que se detallan a continuación (Esquema 12).

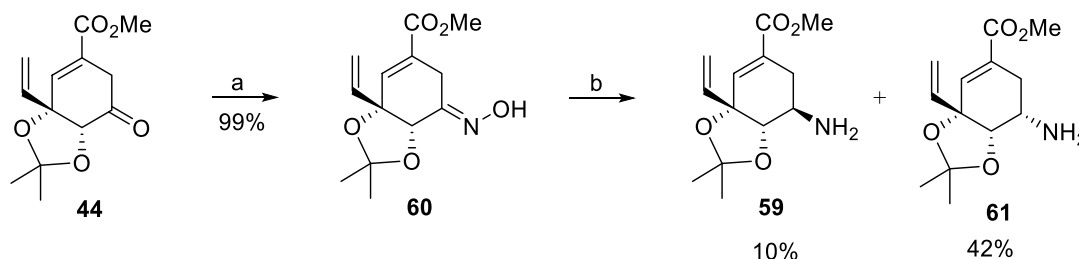


Esquema 12. Aproximación sintética de los compuestos **13**.

Estrategia I

La preparación de la amina **59** se abordó en primer lugar mediante la reducción de la hidroxilimina **60**, que se preparó de forma eficiente por tratamiento de la cetona **44** con el hidrocloreuro de la hidroxilamina y piridina (Esquema 13). Desafortunadamente, la reducción de la hidroxilimina **60** por tratamiento con NaBH_4 en presencia de MoO_3 condujo mayoritariamente a la amina **61** de configuración opuesta a la requerida con un rendimiento del 42%. La amina deseada **59** se obtuvo con un rendimiento del 10%. Este resultado nos pareció sorprendente teniendo en cuenta los resultados anteriormente comentados de la adición nucleófila de organolíticos de zinc (Esquema 8). De ahí que nuestros

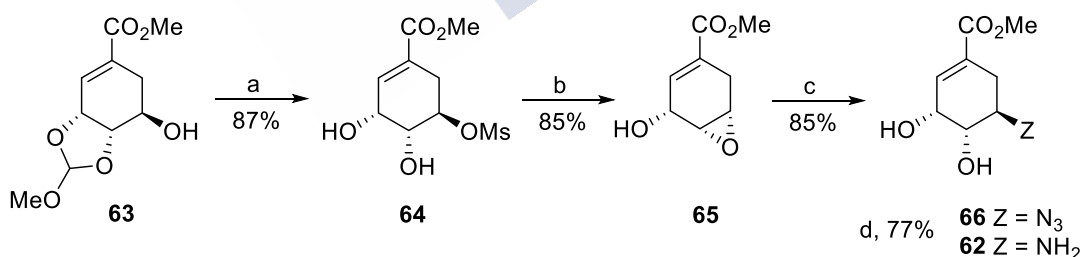
esfuerzos se centraron a continuación en abordar la síntesis de la amina con configuración *R* en posición C5 pero mediante una estrategia alternativa (Estrategia II).



Esquema 13. Reactivos y condiciones: (a) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, Pi , MeOH , t.a. (b) NaBH_4 , MoO_3 , MeOH , t.a.

Estrategia II

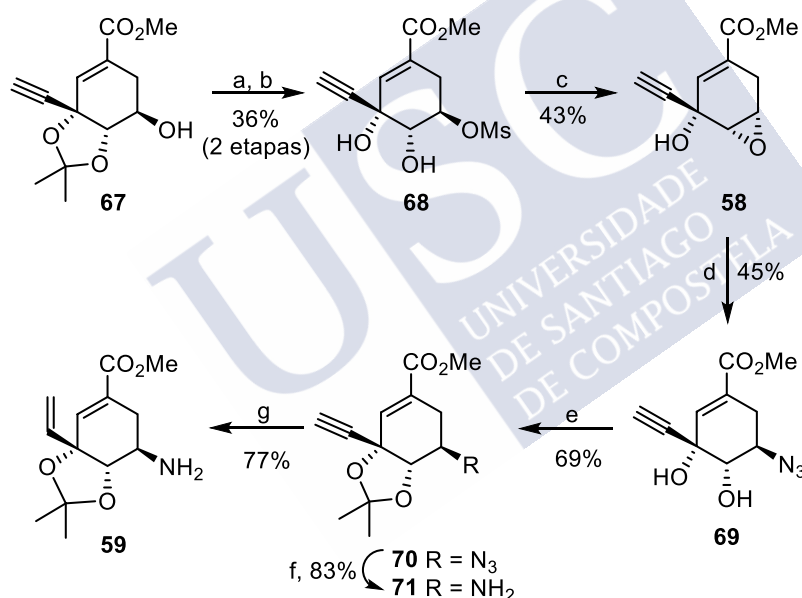
Con anterioridad en el grupo de investigación se sintetizó de forma eficiente la amina **62** mediante la estrategia que se muestra en el Esquema 14 y que implica la apertura del epóxido **65** con azida sódica.^{86,85} En base a estos resultados abordamos la síntesis del intermedio clave en la síntesis de los compuestos objetivo **13** mediante una aproximación similar y que implicó la preparación del epóxido **58** (Esquema 15).



Esquema 14. Reactivos y condiciones: (a) 1. MsCl , Et_3N , DCM , $0\text{ }^\circ\text{C}$ to RT . 2. $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$ (100:1:0.1), RT . (b) NaOMe , MeOH , RT . (c) NaN_3 , AcOH , $40\text{ }^\circ\text{C}$. d) PPh_3 , H_2O , THF , Δ .

El epóxido **58** se logró en cuatro etapas a partir del alcohol conocido **67**⁶⁰: 1) la conversión del grupo hidroxilo en C5 en un buen grupo saliente, 2) desprotección grupo acetal, y 3) sustitución nucleófila intramolecular (Esquema 15). Así, el tratamiento del alcohol **67**⁶⁰ con cloruro de mesilo en presencia de trietilamina, seguido por la desprotección del acetal en medio ácido proporcionó el mesilo **68**

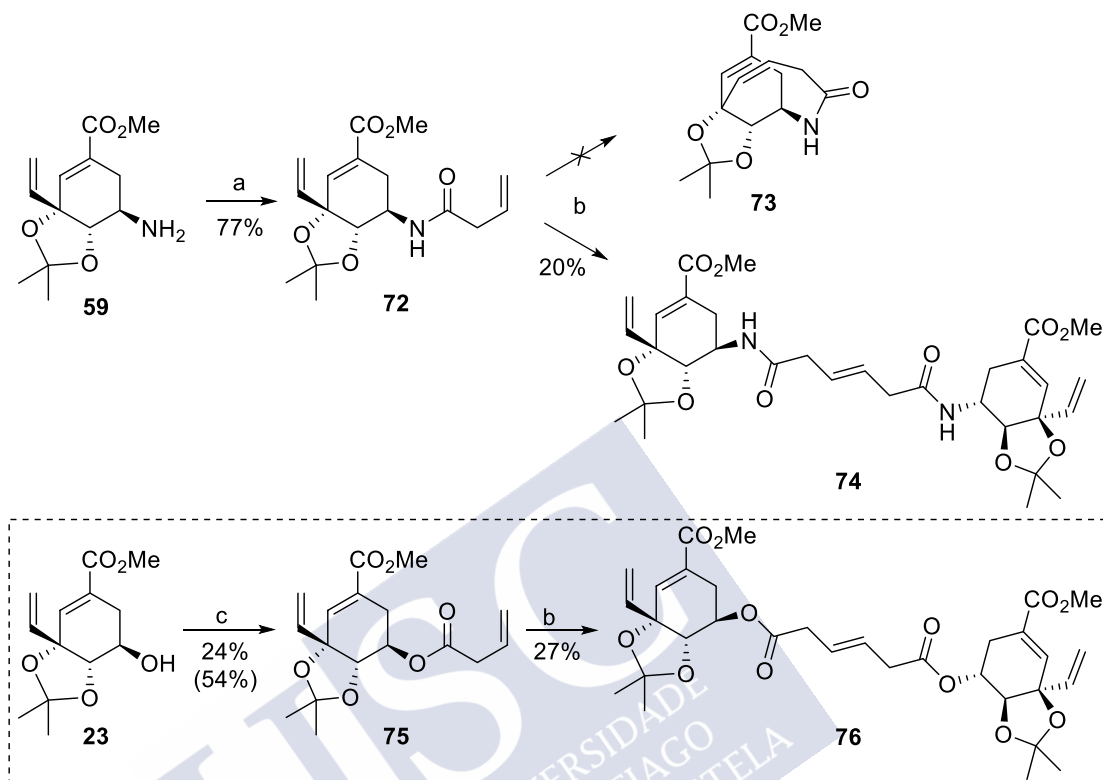
con un rendimiento del 36%. A continuación, el tratamiento del mesilo **68** con metóxido sódico en metanol condujo al epóxido **58** con un rendimiento del 43%. La apertura nucleófila del epóxido **58** por tratamiento con azida sódica en presencia de ácido acético proporcionó la azida **69** con un rendimiento del 45%. A continuación, la protección del diol **69** por tratamiento con 2,2-dimetoxipropano en medio ácido proporcionó el acetal **70** con un rendimiento del 69%. La reducción de Staudinger de la azida **70** por tratamiento con trifenilfosfina en medio acuoso proporcionó la amina **71** con un rendimiento del 83%. Finalmente, la reducción del alquino **71** por tratamiento con el catalizador de Lindlar en atmósfera de hidrógeno condujo a la amina deseada **59** con un rendimiento del 77%.



Esquema 15. *Reactivos y condiciones:* (a) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C. (b) HCl (6 M), MeOH, 60 °C. (c) NaOMe, MeOH, t.a. (d) NaN₃, H₂O, AcOH, 40 °C. (e) CSA, 2,2-DMP, t.a. (f) PPh₃, H₂O, THF, Δ. (g) cat. Lindlar, EtOH, t.a.

Una vez lograda la síntesis eficiente de la amina **59** se abordó la preparación de los compuestos objetivo **13**. Así, el acoplamiento de la amina **59** con ácido 3-butenóico en presencia de EDC y DMAP condujo a la amida **72** con un rendimiento del 77% (Esquema 16). El tratamiento de la amida **72** con catalizador de Grubbs-Hoveyda de segunda generación en tolueno a alta temperatura no resultó en la obtención del derivado bicíclico **73**. En su lugar, el compuesto **72** derivó en el

homodímero **74** con un rendimiento del 20% y se recuperó además sustancia de partida (rendimiento corregido = 98%).



Esquema 16. Reactivos y condiciones: (a) ác. 3-butenoico, EDC, DMAP, CH_2Cl_2 , 0 °C a t.a. (b) cat. Grubbs 2ª generación, PhMe , 90 °C. (c) 1. ácido 3-butenoico, cloruro de oxalilo, 0 °C a t.a. 2. **23**, Et_3N , CH_2Cl_2 , t.a.

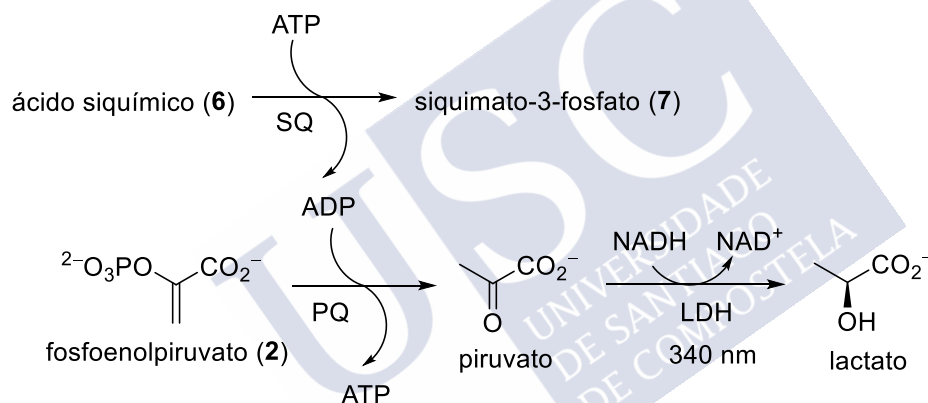
En un esfuerzo por elucidar la causa del resultado no satisfactorio de la reacción de metátesis de cierre de anillo y, con la premisa de que la rigidez impuesta por el enlace amida provoca un impedimento en el cierre intramolecular, se llevó a cabo un estudio de la reactividad de un grupo éster bajo las mismas condiciones de reacción. La síntesis del éster **75** se llevó a cabo a partir del alcohol **23**⁶⁰ en dos etapas (Esquema 16).

Así el tratamiento del alcohol **23** con el cloruro del ácido 3-butenoico, obtenido por tratamiento con cloruro de oxalilo, y en presencia de trietilamina proporcionó el éster **75** con un rendimiento del 24% (rendimiento corregido = 54%). Al igual que en el caso de la amida **72**, el tratamiento del éster **75** con el catalizador de Grubbs-Hoveyda de segunda generación, no proporcionó el biclo deseado sino al

homodímero **76** con un rendimiento del 27%. Ambos resultados reflejan que posiblemente la rigidez impuesta por el grupo carbonilo sea el motivo por el que no se forma el biciclo deseado.

3.6 Evaluación Enzimática de los Compuestos **10**

Se determinaron las propiedades inhibitorias de los análogos **10** frente a las enzimas SQ-Mt y SQ-Hp midiendo de forma indirecta la cantidad de ADP producida, utilizando los enzimas piruvato quinasa (PQ) y lactato deshidrogenasa (LDH) (Esquema 17). Esto se realizó cuantificando mediante espectroscopía UV y a 340 nm la cantidad de NADH consumida.



Esquema 17. Representación esquemática del ensayo enzimático utilizado en la medida de la actividad enzimática de la SQ. PQ = piruvato quinasa. LDH = Lactato deshidrogenasa.

Los ensayos realizados demostraron que ninguno de los análogos **10** son sustratos de este enzima, pero son inhibidores competitivos reversibles. Se midió la velocidad inicial de la reacción en presencia de exceso de ATP, cantidades constantes de ácido siquímico (**6**) y enzima y cantidades crecientes de inhibidor. Los valores de K_i se obtuvieron mediante gráficas Dixon⁹⁷ que consisten en la representación del inverso de la velocidad inicial frente a la concentración de inhibidor a distintas concentraciones de sustrato. A partir de dichas

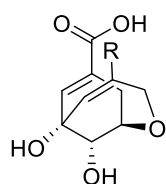
⁹⁷ a) Fersht, A. *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*, 2° Ed., Freeman, W. H., New York, 1999, pág. 103–114. b) Bugg, T. *An introduction to enzyme and coenzyme chemistry*, Blackwell Science, Oxford, 1997, pág 44–53.

representaciones se determinaron los valores de las K_i que se indican en la Tabla 3.

98

Tabla 3. K_i (μM) de los compuestos **10** frente a SQ-*Hp* y SQ-*Mt*

Compuesto	R	<i>H. pylori</i>	<i>M. tuberculosis</i>
21	H	104 ± 4	62 ± 1
10a	Me	54.5 ± 5.7	28 ± 1
10b	Et	15.5 ± 1.1	41 ± 2
10c	<i>n</i> Pr	9.2 ± 1.0	72 ± 4
10d	<i>n</i> Bu	12 ± 2	177 ± 3
10e	CH_2cPr	10.0 ± 0.6	101 ± 2
10f	CH_2OEt	5.0 ± 0.3	170 ± 3
10g	CH_2OBn	68 ± 3	121 ± 5
10h	CH_2OH	38 ± 3	333 ± 10



^aCondiciones de ensayo: Tris.HCl (100 mM, pH 7.7), ATP (2.5 mM), NADH (0.2 mM), PEP (1 mM), MgCl_2 (5 mM), KCl (100 mM), lactato deshidrogenasa/piruvato quinasa (~ 2.8 unidades), 25 °C. Para SQ-*Mt*: K_m (**6**) = $544 \pm 14 \mu\text{M}$; k_{cat} = $295 \pm 8 \text{ s}^{-1}$. Para SQ-*Hp*: K_m (**6**) = $39 \pm 8 \mu\text{M}$; k_{cat} = $116 \pm 4 \text{ ms}^{-1}$.

En general, los compuestos demostraron ser más potentes frente al enzima procedente de *H. pylori* que el de *M. tuberculosis*. Para SQ-*Hp*, las propiedades inhibitorias de los ligandos se incrementan con la longitud de la cadena incorporada en el puente éter, mientras que para SQ-*Mt* solamente la introducción de un grupo metilo mejora el poder inhibitorio del biciclo **21** previamente desarrollado en el grupo. Además, la presencia de un grupo hidroxilo o un grupo éter solo mejora la actividad frente a SQ-*Hp*. El mejor inhibidor de la serie para SQ-*Hp* fue el compuesto **10f**, el cual incorpora un CH_2OEt como sustituyente en el puente éter con una K_i = $5.0 \mu\text{M}$, mejorando 20 veces la capacidad inhibitoria frente al inhibidor **21**. Para SQ-

⁹⁸ Pernas, M.; Blanco, B.; Lence, E.; Thompson, P.; Hawkins, A.; González-Bello, C. *Org. Chem. Front.* **2019**, 6, 2514–2528.

Mt, el compuesto **10a**, el cual posee un grupo metilo, dobló el poder inhibitorio de **21**.

En un esfuerzo por obtener una mejor comprensión a nivel atómico de las diferencias observadas experimentalmente en el poder inhibitorio de los análogos del ácido siquímico conformacionalmente rígidos **10**, en el grupo de investigación se realizaron diversos estudios computacionales que se discuten a continuación.

3.7 Modo de Unión de los Inhibidores 10

En primer lugar se llevaron a cabo estudios de docking con los análogos más potentes en el centro activo de los enzimas *SQ-Hp* y *SQ-Mt*, y el modo de unión propuesto se validó posteriormente mediante simulaciones de DM.⁹⁸ Estos estudios computacionales revelaron que, en todos los casos, los ligandos permanecerían estables en el centro activo del enzima, ya que no se observaron variaciones significativas durante las simulaciones MD, tanto en la posición de los ligandos como en la proteína. Como cabría esperar, los ligandos estarían anclados al centro activo mediante las mismas interacciones electroestáticas y polares que el inhibidor **21** (Figura 19).

Se identificaron diferencias relevantes en la disposición de los sustituyentes del puente éter de los ligandos para ambos enzimas, lo que explicaría el comportamiento obtenido experimentalmente. Así, para *SQ-Hp* y durante la mayoría de la simulación, estos sustituyentes permanecieron inmersos en el centro activo, de hecho, los ligandos se encuentran completamente rodeados por los dominios SB y LID (Figuras 20A–F). Para los compuestos **10b–d** y **10f**, el porcentaje de conformaciones con el sustituyente dentro del centro activo aumenta conforme lo hace la longitud de la cadena, lo cual concuerda con las mejoras observadas en el poder inhibitorio ($\text{CH}_2\text{OEt} > \text{nBu} > \text{nPr} > \text{Et}$) (Figura 20I).

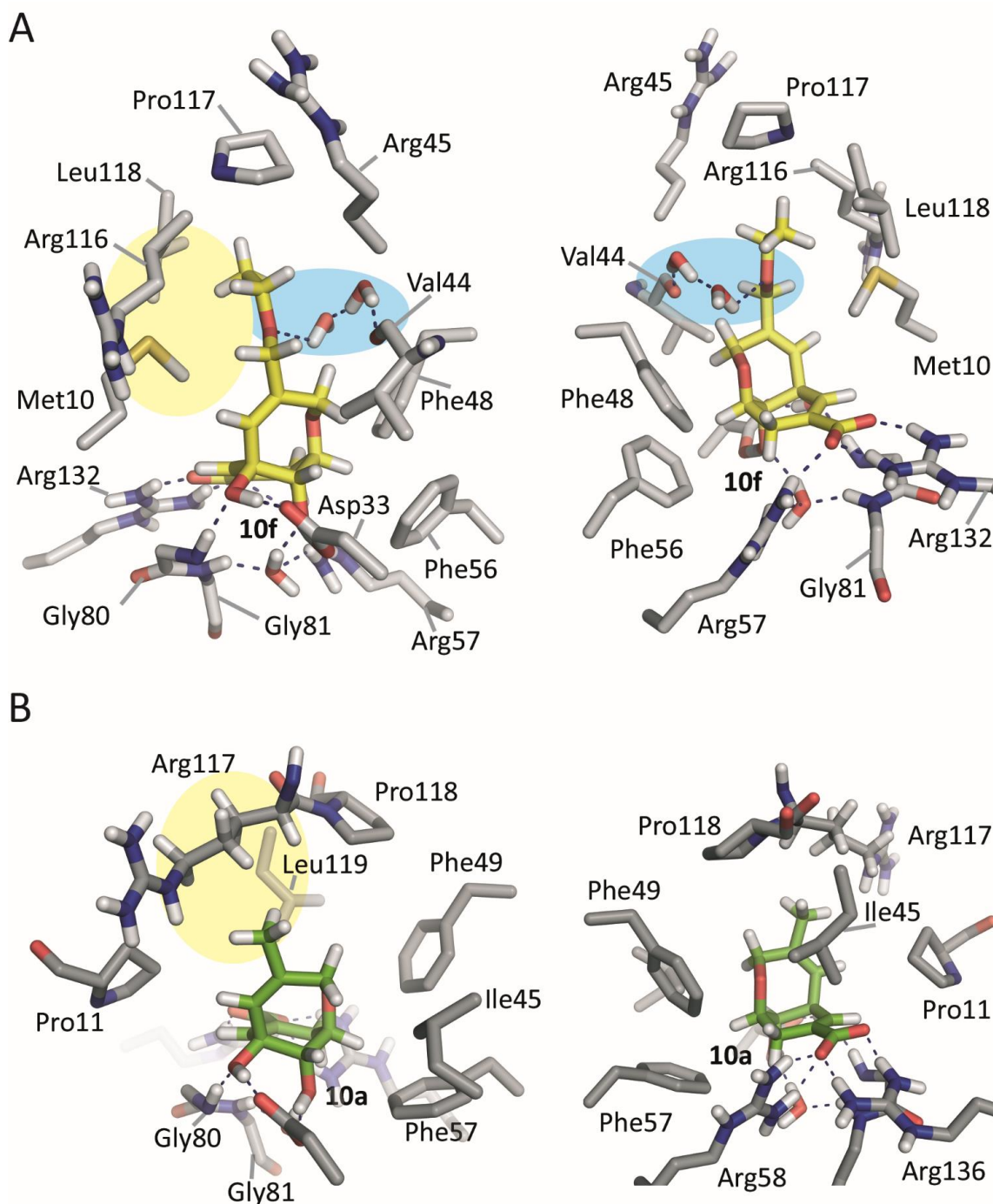


Figura 19. Vista detallada del modo de unión de los inhibidores más potentes contra SQ-*Hp* (A, compuesto **10f**) y SQ-*Mt* (B, compuesto **10a**) en los complejos SQ-*Hp*/ATP/Mg²⁺/**10f** y SQ-*Mt*/ATP/Mg²⁺/**10a**, respectivamente. Se muestran dos perspectivas de cada que corresponden a las instantáneas a los 80 ns de simulación. Se muestran y etiquetan los residuos más relevantes. Las interacciones polares se muestran como líneas discontinuas azules. La sombra azul representa la interacción indirecta del átomo de oxígeno del sustituyente en el puente éter en **10f** con la Val44 de la cadena lateral a través de una red de aguas. La sombra amarilla muestra la proximidad del grupo metilo en **10a** a la cadena carbonada del residuo catalítico Arg117.

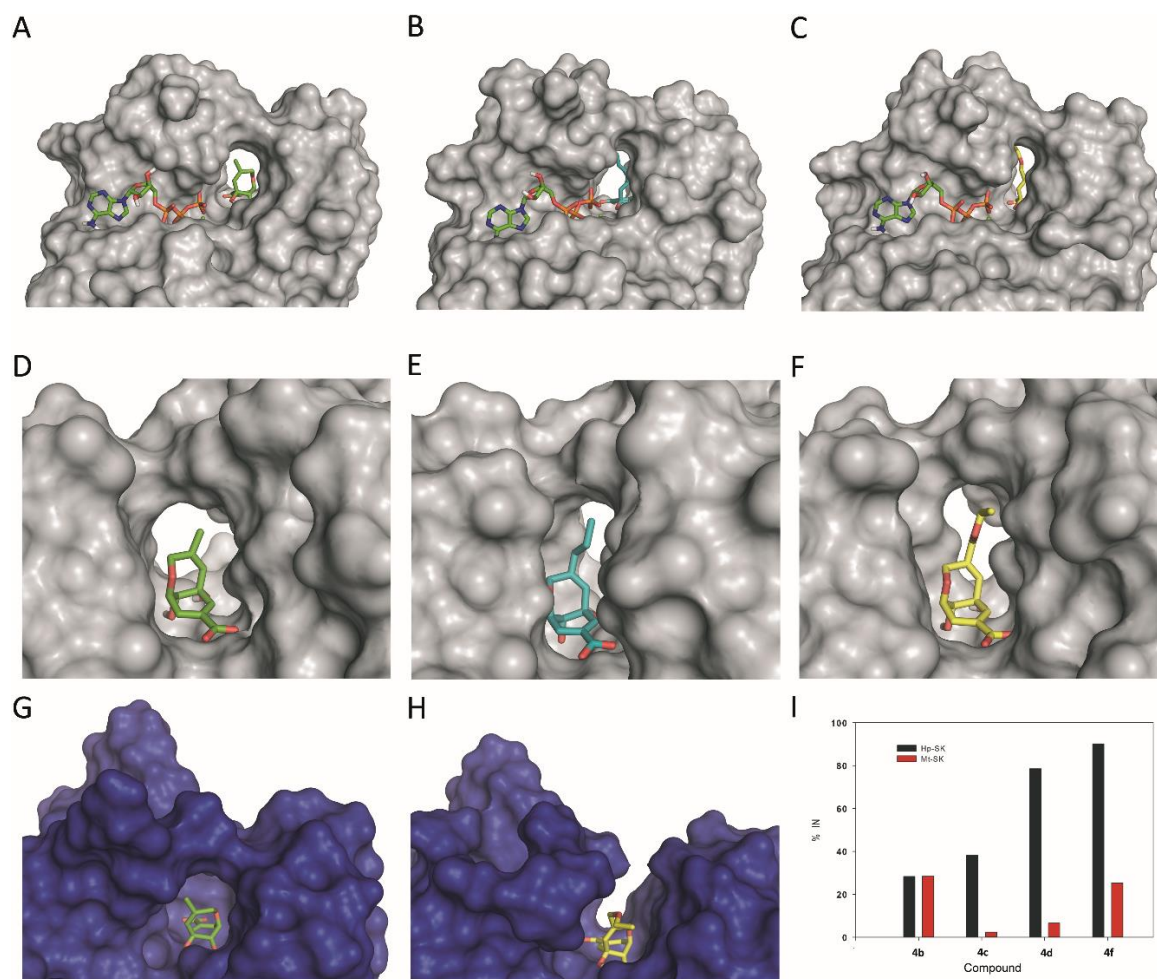


Figura 20. Modo de unión de los compuestos **10a** (verde), **10c** (cian) y **10f** (amarillo) obtenidos mediante docking y estudios de simulación de DM en el centro activo de los enzimas SQ-*Hp* (gris) y SQ-*Mt* (azul oscuro). A–C. Vista general de los complejos SQ-*Hp*/ATP/Mg²⁺/ligando. Se muestran instantáneas después de 80 ns de simulación. Se muestra Mg²⁺ (esfera), ligandos (sticks) y ATP (sticks). D–F. Vista de cerca de los ligandos **10a**, **10c** y **10f** en el bolsillo del dominio SB de SQ-*Hp*. G–H. Vista de cerca de los ligandos **10a** y **10f** en el complejo SQ-*Mt*/ATP/Mg²⁺/ligando. I. Porcentaje de conformaciones de los ligandos **10b–d** y **10f** en los que el sustituyente del puente éter (Et, nPr, nBu, CH₂OEt) se ubicaría apuntando hacia el centro activo del enzima (dentro) durante 100 ns de simulación.

Como resultado de esta disposición, el centro activo del enzima permanece cuidadosamente cerrado, evitando así la entrada del sustrato natural, ya que los ligandos causan una dramática reducción de la flexibilidad del LID y del dominio SB mediante una serie de interacciones apolares favorables entre el sustituyente y los residuos en este bolsillo (Figuras 21A–D). Dichas interacciones apolares serían más numerosas a medida que aumenta la longitud de la cadena del sustituyente, lo que explicaría la mejora en la afinidad del ligando. En general, estas interacciones implicarían los residuos del: (i) LID: Arg116 (esencial), Pro117 (conservado) y

Leu118; (ii) el dominio SB: Val44 y Arg45; y (iii) el loop-P: Met10. Para el inhibidor más potente, el compuesto **10f**, se identificó una interacción adicional entre el átomo de oxígeno del sustituyente y el grupo amida de la cadena principal de Val44 a través de una red de moléculas de agua, lo que explicaría la mayor afinidad de **10f** frente a *SQ-Hp* que **10d**, el cual posee un CH_2 en su lugar (Figuras 21D y C, respectivamente).

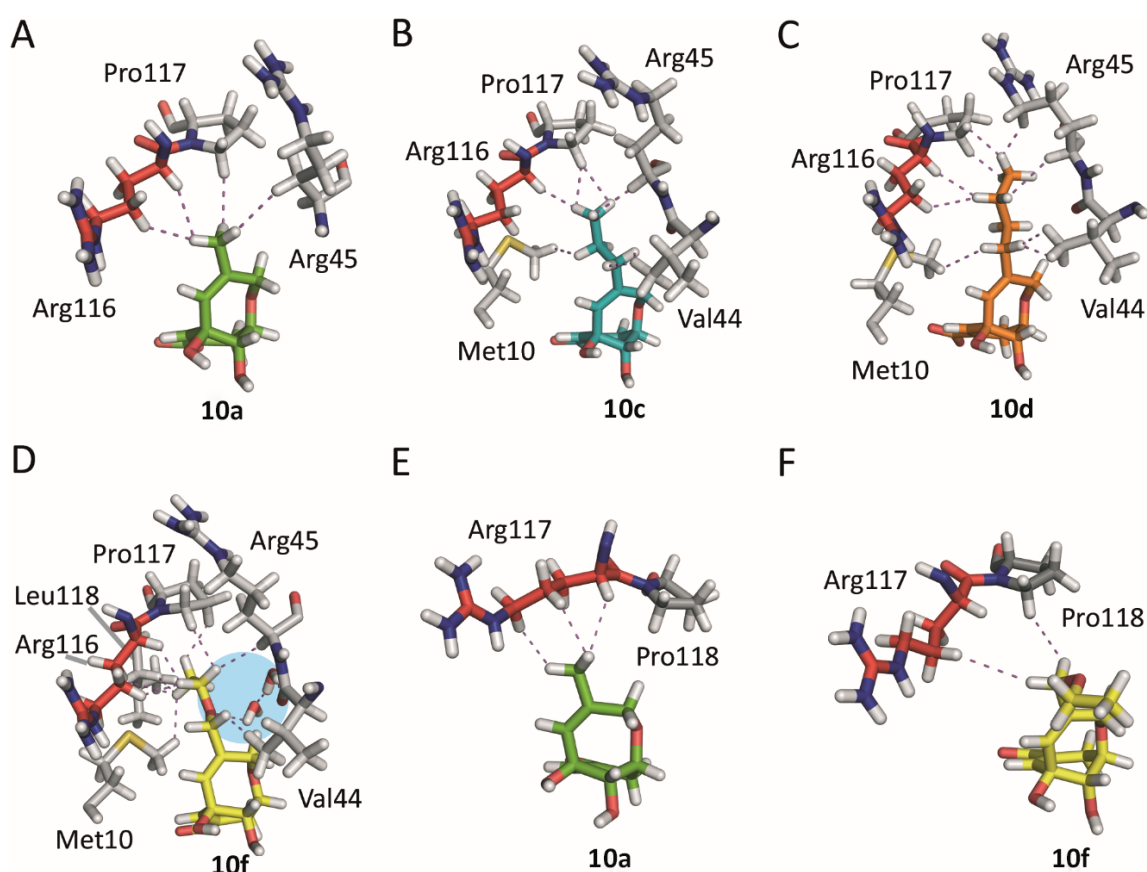


Figura 21. Vista detallada de las interacciones del sustituyente del puente éter en **10a**, **10c–d** y **10f** con *SQ-Hp* (A–D) y en **10a** y **10f** con *SQ-Mt* (E–F) en sus respectivos complejos con el enzima. Se muestran y etiquetan los residuos más relevantes de las cadenas laterales. Las interacciones apolares (magenta) y polares (azul) se muestran como líneas discontinuas. La interacción del átomo de oxígeno del sustituyente en **10f** con la amida de la cadena principal de Val44 a través de una red de aguas se destaca con una sombra azul.

Por el contrario, para *SQ-Mt*, a medida que la longitud del sustituyente aumenta, los ligandos estarían localizados preferentemente con el sustituyente apuntando hacia fuera del centro activo, de hecho, en la Figura 20H puede verse como para el ligando **10f** el sustituyente en el puente éter no estaría insertado en el centro activo

como ocurre para el enzima procedente de *H. pylori* (Figuras 20G–H). Debido a esta premisa, la introducción de este tipo de sustituyentes en el inhibidor **21** no contribuiría a una mejora en la afinidad del ligando puesto que no se producirían interacciones favorables adicionales con los residuos del centro activo (Figuras 21E–F).

Destacar además, que para ambos enzimas los sustituyentes de los ligandos interaccionan con una región similar del LID, que en términos de secuencias de aminoácidos es muy parecida. Sin embargo, los resultados de los estudios computacionales revelaron un ajuste inducido por los ligandos marcadamente distintos para los dos enzimas, lo que explicaría las diferencias encontradas. Esto se debe a diferencias clave del plegado del LID sobre el centro activo, una situación que se visualiza fácilmente mediante el análisis de los modos vibracionales de los dos enzimas (Figura 22).

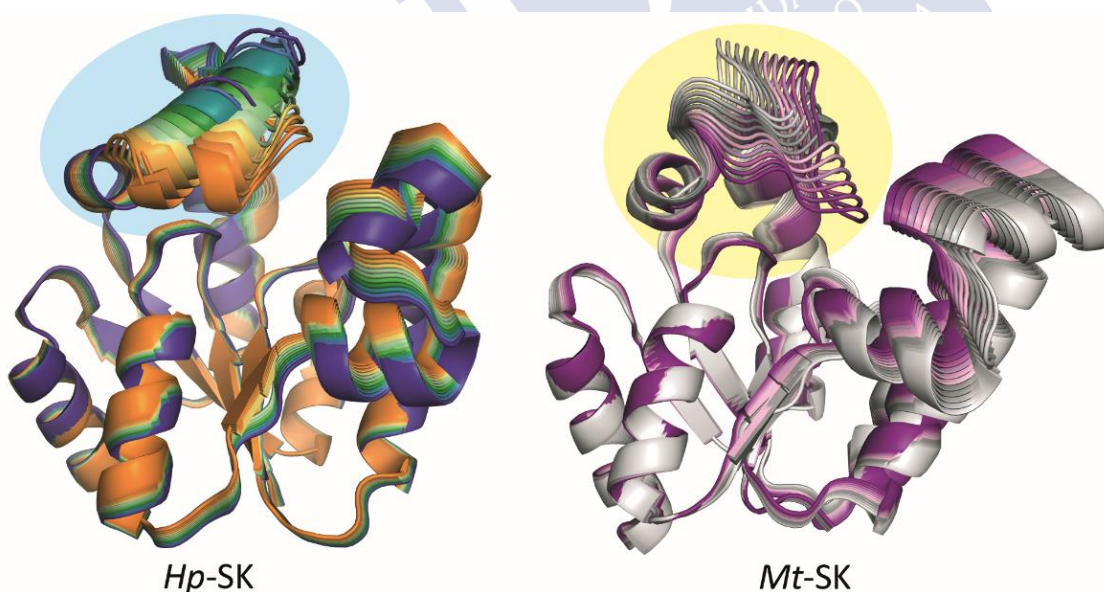


Figura 22. Vista general del movimiento de SQ-*Hp* y SQ-*Mt* obtenido mediante examinación del modo de vibración. El movimiento del LID está marcado con sombras en azul y amarillo. Se observa como el pliegue del LID, y como consecuencia la arginina esencial que contiene, es bastante diferente en los dos enzimas.



Capítulo 4. Inhibidores que Alteran la Conformación Activa de la SQ



4.1 Inhibidores que Estabilizan una Conformación Cerrada e Inactiva del Enzima

4.1.1 Antecedentes – Planteamiento

En nuestro grupo de investigación demostramos que los ácidos 3-aminosiquímicos **77** y **78** son inhibidores reversibles competitivos de la SQ-Mt con una K_i entre 62 y 65 μM , respectivamente (Figura 23A).⁶⁰ El modo de unión de los compuestos **77–78** en el centro activo de la SQ-Mt, que se estudió mediante docking y simulaciones de DM, reveló que en ambos casos el anillo ciclohexeno se uniría de forma similar que el sustrato natural, incluso en el caso del ligando **78**, el cual posee estereoquímica opuesta en la posición C3 (Figuras 23B–D). Esto es debido a que ambos grupos amino en C3 interaccionarían con el γ -fosfato de ATP mediante una fuerte interacción electrostática que favorece que el nucleótido y el dominio SB se mantengan muy próximos. De hecho, el enlace de hidrógeno entre las cadenas laterales de los residuos de Ser16 y Asp32 se mantuvieron $\approx 1.5\text{--}1.7$ Å durante la simulación. Como consecuencia, la flexibilidad del LID y del dominio SB se ve drásticamente reducida. Particularmente, en el caso del ácido 3-epi-aminosiquímico (**78**) ambos dominios están incluso más cerca que en el complejo de Michaelis y con su epímero **77**. Se ha postulado que la interacción de enlace de hidrógeno entre las cadenas laterales de los residuos de Asp32 y la Ser16, éste último localizado cerca del grupo γ -fosfato del ATP, contribuiría a la aproximación de ambos sustratos durante la reacción de fosforilación. Además, estudios preliminares de nuestro grupo de investigación del mecanismo catalítico revelan que el residuo Asp32 tiene un papel clave en la etapa de reacción del metafosfato intermedio, en concreto en los cambios producidos en la coordinación del Mg^{2+} necesarios para la transferencia del grupo fosfato al grupo hidroxilo en posición C3. Estudios de mutación dirigida realizados en nuestro grupo de investigación en los que se cambió el grupo Asp32 por un grupo amida (Asp32Asn) revelaron que dicho

grupo es esencial para la catálisis al no observarse actividad enzimática con este enzima variante.⁹⁹

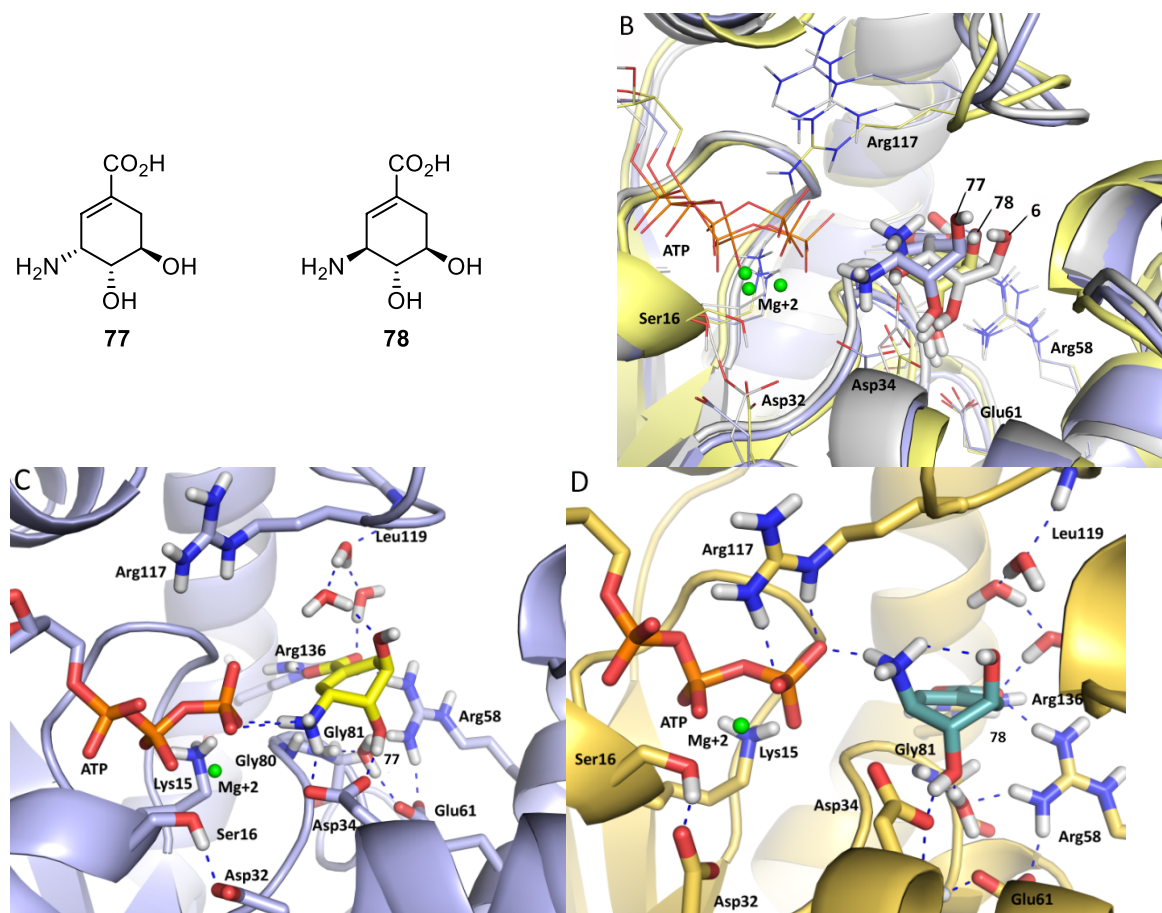


Figura 23. A) Inhibidores reversibles competitivos de SQ-Mt. B) Comparación del modo de unión de los ácidos aminosquímicos **77** y **78** con el sustrato natural. Modos de unión de los compuestos **77** (C) y **78** (D) obtenidos mediante estudios de simulación. Se muestran y etiquetan las cadenas laterales de residuos relevantes. Se indican las Interacciones polares (azul) y las lipofílicas (naranja) más relevantes.

A diferencia del compuesto **77**, el ácido 3-epi-aminosquímico (**78**) carece de la posible interacción enlace de hidrógeno con la cadena lateral del residuo conservado de Asp34, y la red de agua estaría desplazada sobre 1–1.5 Å desde el grupo carboxilato C1 y el hidroxilo C5 como consecuencia de la disposición axial del grupo amino. A pesar de esto, el grupo hidroxilo C5 se mantendría axial mediante una fuerte interacción intramolecular de enlace de hidrógeno con el grupo amino del C3. Globalmente, parece que las interacciones de unión de ambos ácidos

⁹⁹ Resultados sin publicar.

aminosiquímicos son similares, y que la interacción con el grupo γ -fosfato de ATP parece ser crucial para su anclaje en el centro activo, una situación que puede explicar la similar capacidad inhibitoria de ambos compuestos.⁶⁰

Teniendo estos precedentes, se estudió el efecto de la funcionalización del grupo amino del ácido aminosiquímico **78** con diversas cadenas alquílicas funcioalizadas con heterociclos, los compuestos **14–15**, capaces de establecer interacciones de enlace de hidrógeno con la interfase que separa ambos centros activos, el del ácido siquímico y el del ATP (Figura 24). Además, se analizó el efecto de la sustitución de una unión tipo amina por una tipo éter mediante los compuestos **16**. A su vez, los compuestos **16** incorporarían un grupo triazol con la idea de favorecer las interacciones del espaciador con residuos del centro activo.

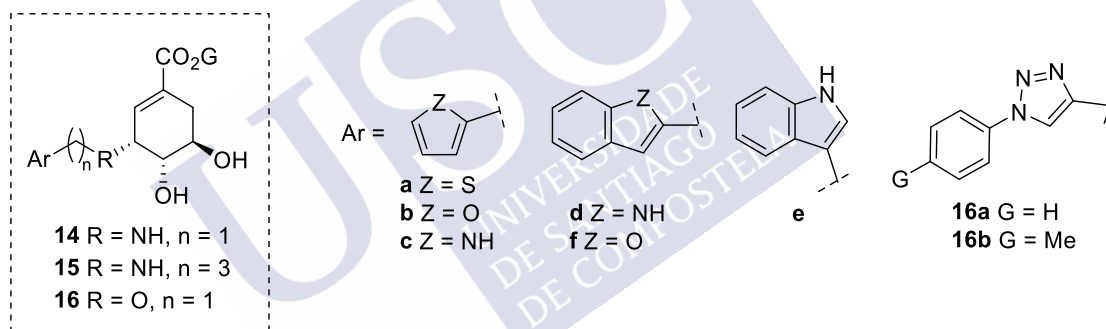
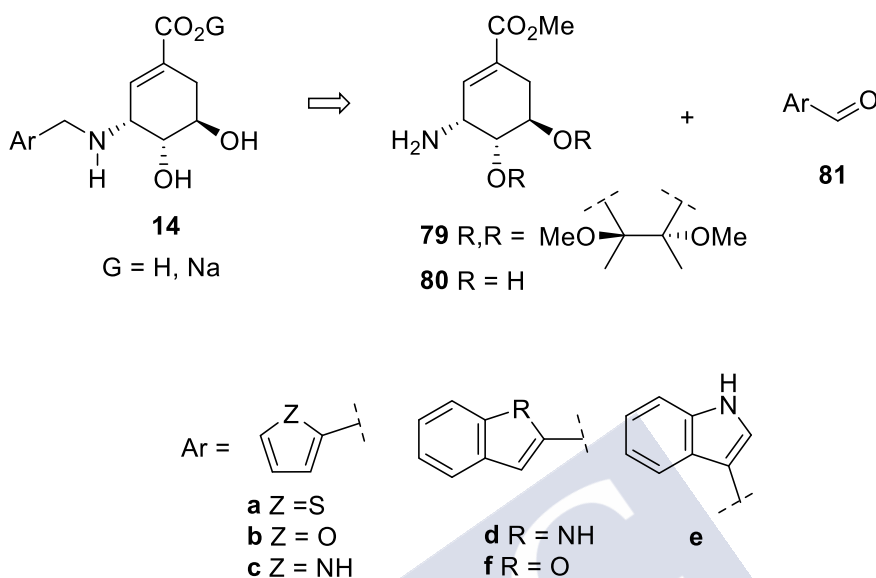


Figura 24

4.1.2 Síntesis de las *N*-alquilaminas **14**

La estrategia propuesta para la síntesis de los compuestos **14**, implicaría la incorporación de la cadena carbonada en el grupo amino de los compuestos previamente descritos **79**⁹⁵–**80**⁶⁰ mediante una reacción de aminación reductora utilizando los aldehídos **81** (Esquema 18). En base a los estudios de docking y dinámica molecular realizados en el grupo de investigación, los análogos que incorporan un anillo de furano y tiofeno serían los que proporcionarían menor afinidad por el enzima. Sin embargo, estos compuestos, que serían menos polares

ya que carecen del grupo amino extra presente en los que tienen un anillo de pirrol o indol, se escogieron para la puesta a punto de la estrategia sintética.

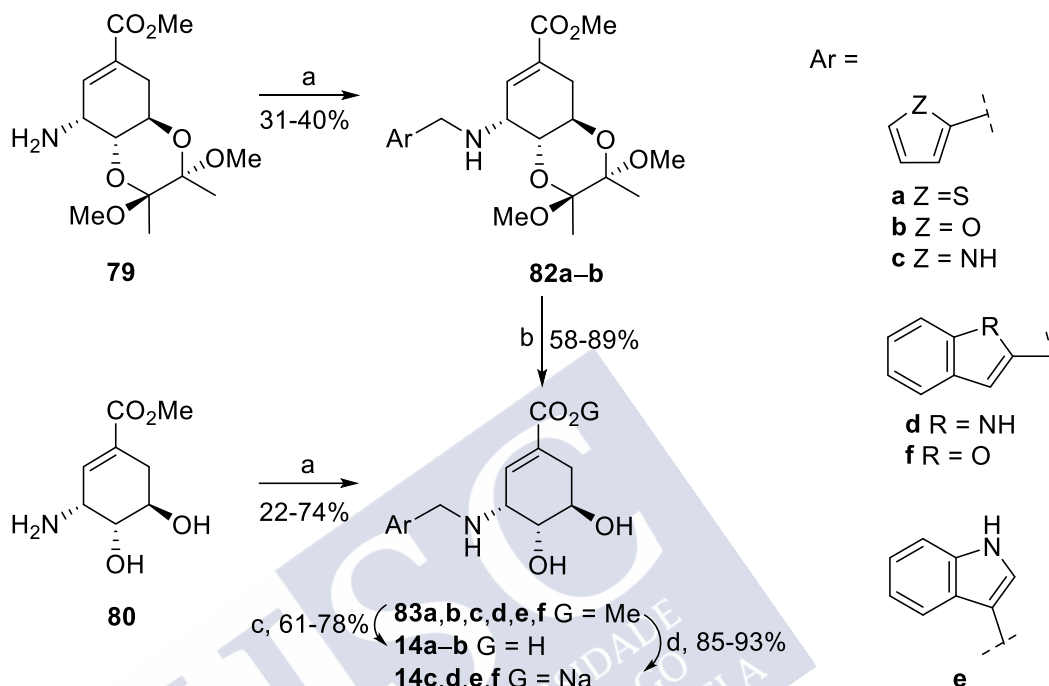


Esquema 18.

En primer lugar, se abordó la síntesis de los compuestos **14a–b** funcionalizados con un anillo de furano y tiofeno (Esquema 19). Así, la aminación reductora de la amina **79**⁹⁵ por tratamiento con los aldehidos comerciales, furano-2-carboxaldehido (**81a**) y tiofeno-2-carboxaldehido (**81b**), y cianoborohidruro sódico en presencia de tamices moleculares, proporcionó satisfactoriamente las aminas **82a–b**, respectivamente. A continuación, la desprotección del grupo acetal por tratamiento con ácido trifluoroacético acuoso proporcionó los alcoholes **83a–b** con un buen rendimiento. Finalmente, la hidrólisis básica de los ésteres metílicos **83a–b** por reacción con hidróxido de litio seguido de tratamiento con la resina de intercambio iónico CG-50 (H^+) condujo satisfactoriamente a los ácidos deseados **14a–b**.

A diferencia de los compuestos **14a–b**, los análogos que incorporan los derivados de pirrol e indol se prepararon de forma análoga, pero a partir del amino alcohol **80**⁶⁰. Esto se debe a que experimentos previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, pusieron de manifiesto que los correspondientes análogos **83c–d** son

difíciles de aislar del medio ácido necesario para la desprotección del grupo acetal debido a la presencia de dos grupos amino. A diferencia de los análogos **14a–b**, los compuestos **14c–d** se prepararon en forma de sal sódica por la misma razón.



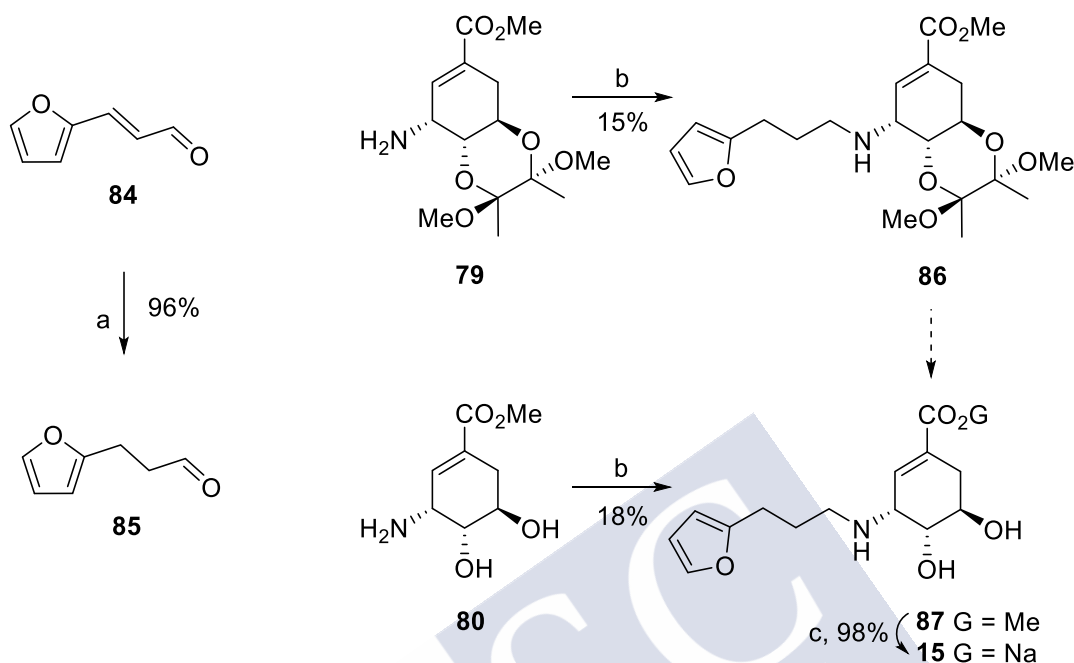
Esquema 19. Reactivos y condiciones: (a) ArCH_2CHO (**81**), NaOAc, NaCNBH_3 , tamices moleculares 4 Å, MeOH, t.a. (b) TFA/ H_2O (20:1), t.a. (c) 1. LiOH (ac.), THF, t.a. 2. Amberlita GC-50 (H^+). (d) NaOH (ac.), THF, t.a.

4.1.3 Síntesis del Compuesto 15

La síntesis de la *N*-alquilamina **15** funcionalizada con una cadena de 3 átomos de carbono y un furano se llevó a cabo siguiendo una estrategia similar a la desarrollada para los compuestos **14**. El aldehído **85** necesario para la síntesis del compuesto **15** se abordó mediante la reducción del doble enlace en **84** previamente descrita por Naud¹⁰⁰ y colaboradores (Esquema 20). La aminación reductora de la amina **80** con el aldehído **85** proporcionó el compuesto **87** en tan solo un 18% de rendimiento. La baja eficacia de la reacción nos llevó a estudiar la aminación reductora de la amina protegida **79** con el aldehído **85**, sin embargo, también en

¹⁰⁰ Naud, S.; Macnaughton, S. J.; Dyson, B. B. S.; Woollaston, D. J.; Dallimore, J. W. P.; Robertson, J. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3506–3518.

este caso se obtuvieron bajos rendimientos. La hidrólisis básica del éster metílico **87** condujo satisfactoriamente a la sal sódica deseada **15**.

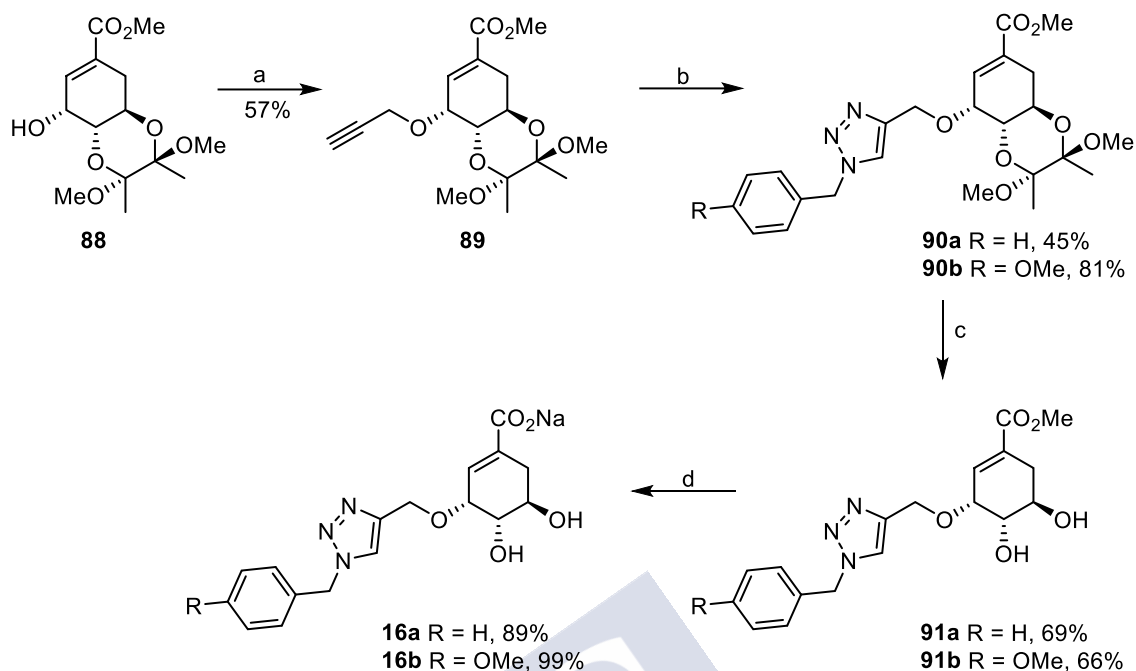


Esquema 20. *Reactivos y condiciones:* (a) Cp_2TiCl_2 , Zn, EtNH^+Cl^- , CH_2Cl_2 , t.a. (b) **85**, NaOAc, NaCNBH_3 , tamices moleculares 4 Å, MeOH, t.a. (c) NaOH (ac.), THF, t.a.

4.1.4 Síntesis de los Triazoles **16**

La síntesis de los triazoles **16** se llevó a cabo a partir del alcohol previamente descrito **88**¹⁰¹ que se sintetizó en una sola etapa a partir del ácido siquímico (**6**) (Esquema 21). La alquilación del alcohol **88** con bromuro propargílico en presencia de hidruro sódico a temperatura ambiente proporcionó el alquino **89** en un rendimiento del 54%. Cicloadición 1,3-dipolar catalizada por cobre (II) entre el alquino **89** y la azida correspondiente condujo a los triazoles **90**. La desprotección en medio ácido del grupo bisacetal en **90** proporcionó los alcoholes **91**. Finalmente, la hidrólisis básica de los compuestos **91** condujo a los compuestos deseados en forma de sal sódica **16**.

¹⁰¹ Zhang, Y.; Liu, A.; Ye, Z. G.; Lin, J.; Xu, L. Z.; Yang, S. L. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, 54, 1459–1461.



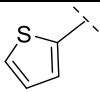
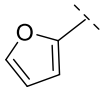
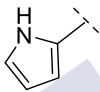
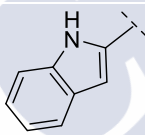
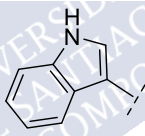
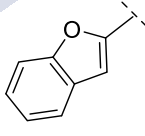
Esquema 21. Reactivos y condiciones: (a) NaH, CHCCH₂Br, THF, t.a. (b) ArCH₂N₃, ascorbato sódico, tBuOH/H₂O, CuSO₄, t.a. (c) TFA/H₂O, 0 °C. (d) NaOH (ac), THF, t.a.

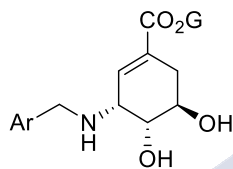
4.1.5 Evaluación Enzimática de los Compuestos 14–16

Se ensayaron las propiedades inhibitorias de los compuestos **14–16** frente a SQ-Mt en presencia de ácido siquímico (**6**) y ATP. Los valores de inhibición (K_i) de los compuestos **14**, que se obtuvieron mediante gráficas Dixon, se resumen en la Tabla 4. Ninguno de los compuestos actuó como sustrato del enzima. Todos compuestos demostraron ser inhibidores competitivos reversibles pero con valores de K_i superiores a la K_m y superiores al compuesto de referencia **77**. De entre ellos destacan los compuestos **14a–b**, que incorporan un anillo de tiofeno y furano, con constantes de inhibición de 360 y 340 μ M, respectivamente.

Los compuestos **15–16** tampoco mostraron ser buenos inhibidores de la SQ-Mt.

Tabla 4. K_i (μM) de los compuestos **14** frente a SQ-Mt

Entrada	Compuesto	Ar/R	<i>M. tuberculosis</i>
1	14a		360 ± 11
2	14b		340 ± 10
3	14c		1600 ± 70
4	14d		2520 ± 60
5	14e		900 ± 39
6	14f		$>2000 \pm$



Condiciones de ensayo: Tris.HCl (100 mM, pH 7.7), ATP (2.5 mM), Fosfoenolpiruvato (1 mM), MgCl_2 (5 mM), KCl (100 mM), lactato deshidrogenasa/piruvato quinasa (~ 2.8 unidades), 25 °C. Para SQ-Mt: K_m (**6**) = $544 \pm 14 \mu\text{M}$; k_{cat} = $295 \pm 8 \text{ s}^{-1}$.

4.2 Inhibidores que Estabilizan una Conformación Abierta e Inactiva del Enzima

4.2.1 Precedentes – Planteamiento

El bolsillo apolar responsable de aislar el sustrato natural del medio acuoso está situado en el dominio SB y rodea a los grupos hidroxilo C4 y C5 del ácido siquímico

(6). Como ya se mencionó con anterioridad, este bolsillo es muy conservado y está formado por residuos lipofílicos, principalmente por los residuos Phe48/Phe49, Phe56/Phe57, Ile36/Ile37 y Val44/Ile45 (en *H. pylori* y *M. tuberculosis*, respectivamente) (Figura 25). A ello contribuyen además los residuos: (i) Leu51, Leu42, Val40 y Ile47 en SQ-*Hp*; y (ii) Ile60 y Ile48 en SQ-*Mt*. Como se mencionó en la introducción, el dominio SB sufre un gran cambio conformacional durante la expulsión del producto del centro activo.

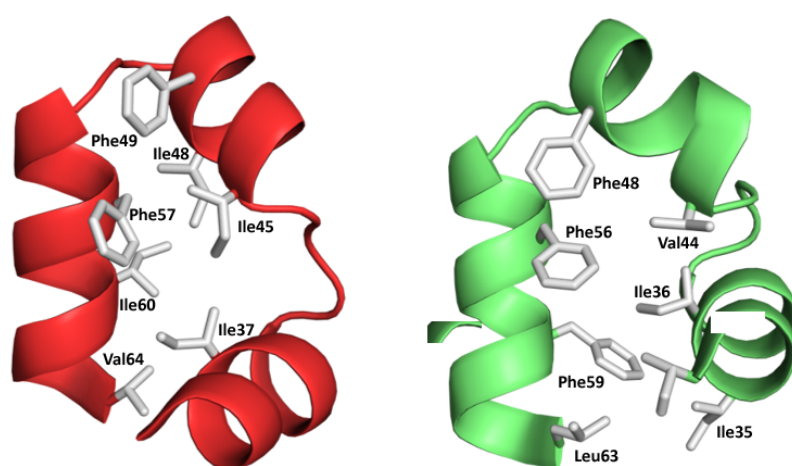


Figura 25. Vista detallada del bolsillo apolar en el dominio de los enzimas SQ-*Mt* (rojo) y SQ-*Hp* (verde). Se muestran y etiquetan las cadenas laterales de los residuos más relevantes.

Teniendo todo esto en cuenta, en nuestro grupo de investigación se desarrollaron inhibidores de la SQ capaces de impedir el cierre apropiado del centro activo para la catálisis, cuya afinidad por el enzima se vería incrementada debido a la incorporación de cadenas bencílicas en la posición C5 del ácido siquímico dirigidas a interactuar con el bolsillo apolar del dominio SB, los compuestos **92** y **93** (Figura 26).^{85,86} Los derivados bencílicos del ácido siquímico **92** y **93** mostraron constantes de inhibición en el rango del bajo de micromolar e incluso nanomolar. En general, los compuestos son más potentes frente a SQ-*Hp* que a SQ-*Mt*. Entre ellos destaca el compuesto **93a**, que posee una K_i de 300 nM frente a SQ-*Hp* lo que lo convierte en el inhibidor competitivo reversible más potente conocido hasta la fecha frente a este enzima. El compuesto **92b** también

demostró ser muy eficaz con una K_i de 560 nM frente a SQ-*Hp*. Pero lo que es más importante, ensayos *in vitro* con el ester metílico derivado de **92b**, proforma del mismo, revelaron que posee una CIM (concentración inhibitoria mínima) de 4 $\mu\text{g/mL}$ frente a *H. pylori*, lo que demuestra la validez tanto de la aproximación basada en el movimiento, como la diana terapéutica.

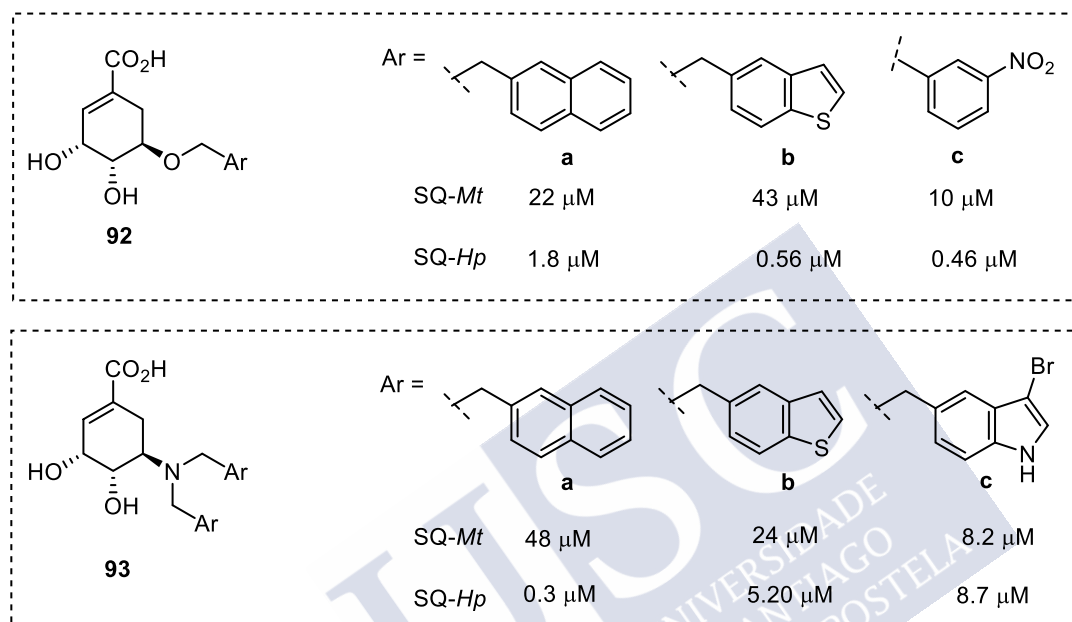


Figura 26. Inhibidores del enzima SQ-Mt y SQ-*Hp* previamente desarrollados en el grupo de investigación. Se muestran los valores de las constantes de inhibición.

Por otra parte, resultados previos junto con los logrados con los compuestos **93** revelan que la presencia de dos cadenas alquílicas en el átomo de nitrógeno del C5 es crucial para lograr la inhibición de la SQ, porque reduce la basicidad del grupo amino y evita su protonación en condiciones neutras. Además, se comprobó que el compuesto más activo frente a SQ-*Hp*, el compuesto **93a**, es el menos activo frente a SQ-Mt, y al revés, el más activo frente a SQ-Mt, es el peor frente a a SQ-*Hp*. Esto se debe a que el modo de unión de los ligandos **93** es marcadamente distinto en el centro activo de *H. pylori* y *M. tuberculosis* debido a las diferencias antes comentadas en el movimiento intrínseco de ambas. En base a estos resultados nos pareció interesante estudiar si este mismo efecto se podría obtener cuando el grupo amino de la posición C5 estuviese funcionalizado con un grupo

bencílico y una cadena alquílica. Con este objetivo abordamos la síntesis de los compuestos **17** (Figura 27). Se escogieron los anillos de naftaleno y benzotiofeno porque eran los que con anterioridad nos proporcionaron los mejores resultados (Figura 26). Se estudió además el compuesto **27b**, que incorpora un anillo de naftaleno funcionalizado con un grupo metilo en base al modo de unión del compuesto **93a** previamente estudiado.

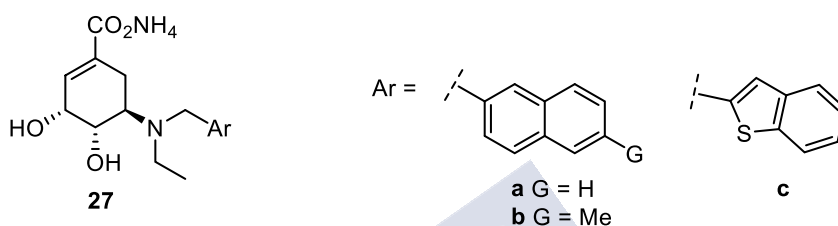
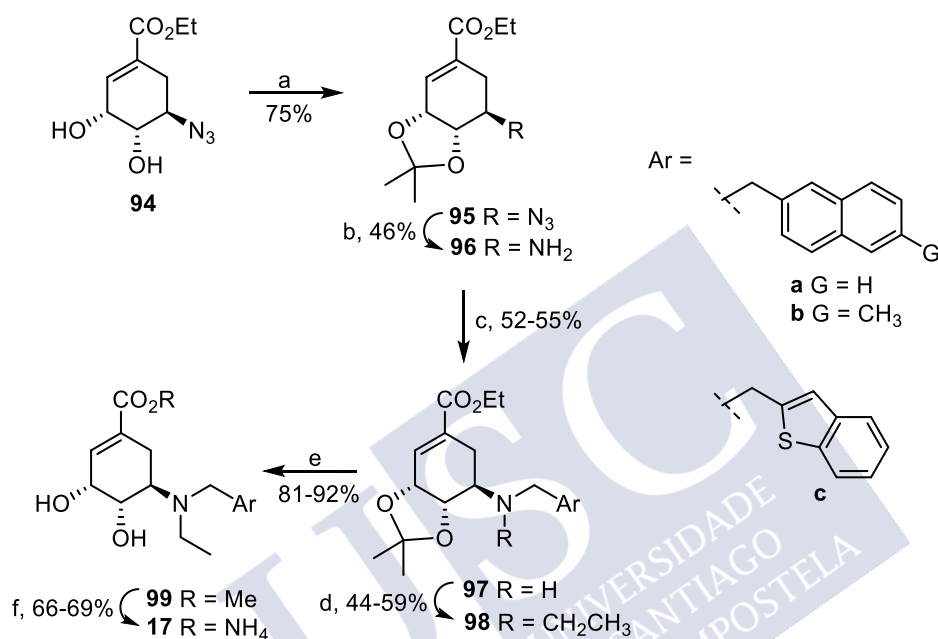


Figura 27

4.2.2 Síntesis de los Compuestos 17

La síntesis de las aminas terciarias **17** se llevó a cabo a partir de la azida **94**, anteriormente descrita en el grupo (Esquema 22). En primer lugar, la protección del *cis*-1,2-diol **94** proporcionó el acetal **95**. La reducción de la azida **95** mediante una reacción de Staudinger por tratamiento con trifenilfosfina en presencia de agua y a reflujo proporcionó la amina **96** con un rendimiento del 46%. Una primera aminación reductora de la amina **96** por tratamiento con el correspondiente aldehído aromático, acetato sódico y cianoborohidruro sódico en presencia de tamices moleculares resultó en las aminas **97** con rendimientos entorno al 50%. La subsecuente aminación reductora de las aminas **97** bajo condiciones similares, pero utilizando acetaldehído, proporcionó las aminas terciarias **98** (44-59%). A continuación, la desprotección en medio ácido y a 60 °C del grupo acetal en **98** proporcionó los dioles **99**. Con objeto de facilitar la purificación de los productos, se emplearon ésteres etílicos en la ruta sintética, ya que en pruebas realizadas anteriormente en el grupo estos habían demostrado ser más fácilmente aislables, sin embargo, la hidrólisis básica de los mismos resultó ser más complicada. El exceso

de sales requerido para la completa hidrólisis de los ésteres **99** se eliminaron por cromatografía de intercambio iónico utilizando la resina de intercambio iónico DOWEX 50 W 8-400, de esta forma se obtuvieron los compuestos deseados **17a-b** en forma de sal amónica sales amónicas **17**. El compuesto **17c** que incorpora un anillo benzotiofeno no fue posible aislarlo de forma pura.



Esquema 22. Reactivos y condiciones: (a) DMP, CSA (cat.), t.a. (b) PPh₃, H₂O, THF, Δ. (c) ArCHO, NaCNBH₃, NaOAc, 4 Å MS, t.a. (d) CH₃CHO, NaCNBH₃, NaOAc, 4 Å MS, t.a. (e) HCl (6 M), EtOH, 60 °C. (f) 1. NaOH (ac.), THF, 60 °C. 2. DOWEX 50 W 8-400 (amonio).

La evaluación biológica de los compuestos **17** no resultó exitosa puesto que los análogos **17** no mejoraron la capacidad inhibitoria de los inhibidores desarrollados con anterioridad.

4.3 Estudio del Efecto de un Sustituyente en C4

4.3.1 Planteamiento

Como se mencionó en la introducción el movimiento intrínseco de la SQ procedente de *M. tuberculosis* es muy distinto del enzima procedente de *H. pylori* (Figura 28A–B).

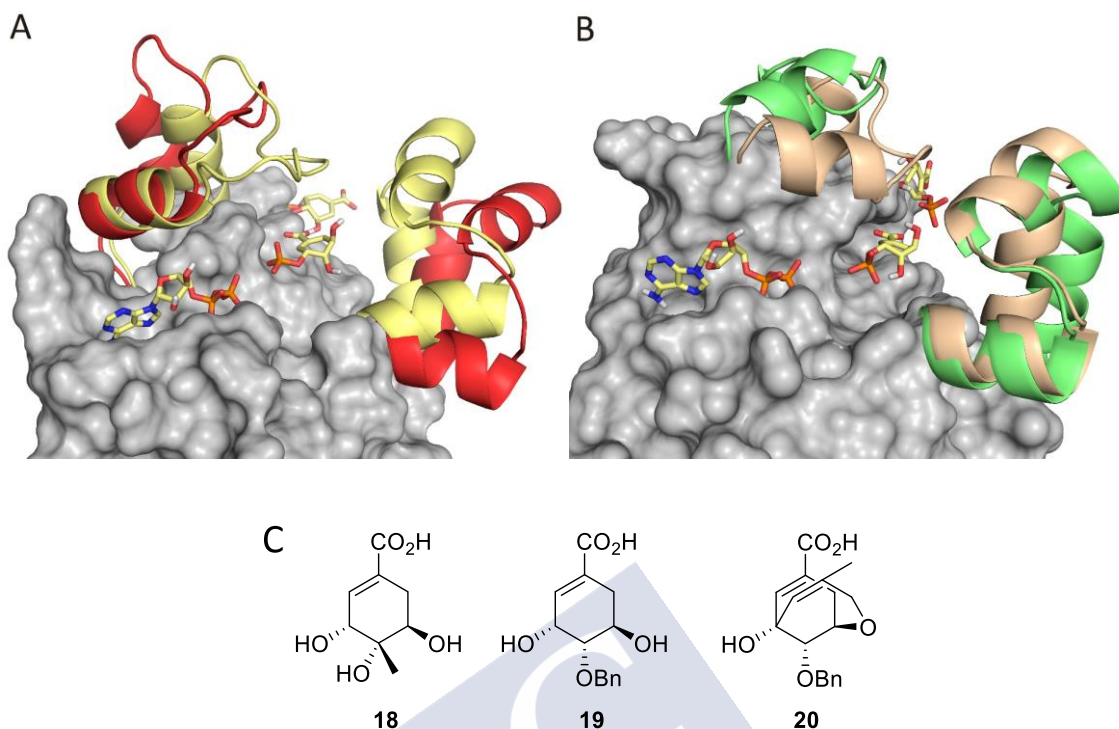


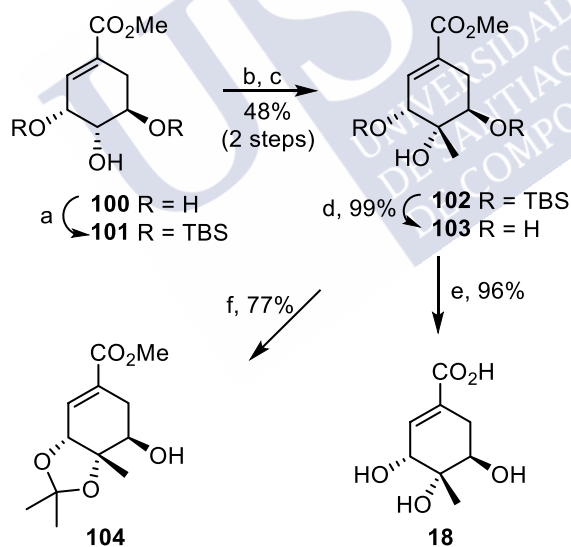
Figura 28. Comparativa de la forma abierta y cerrada del enzima SQ-Mt (A) y SQ-Hp (B). Se muestra la posición del siquimato-3-fosfato al principio y al final de la simulación. C. Compuestos 18–20.

Esto explica que los éteres bencílicos **92** o las aminas terciarias **93** que incorporan una y dos cadenas bencílicas, respectivamente, en la posición C5 del ácido siquímico, son en todos los casos más potentes frente a SQ-*Hp* que a SQ-*Mt*. Los estudios computacionales revelan que, en todos los casos, estos grupos bencílicos se sumergen adecuadamente en el dominio SB porque el movimiento (twist) del mismo, y la disposición que adopta el grupo bencílico, por así decirlo, están sintonizados. Sin embargo, en el caso de SQ-*Mt*, como la apertura del centro activo es como el movimiento de un acordeón, es decir amplía y con un movimiento en bloque del dominio SB, todavía existe mucha área disponible para lograr arropar adecuadamente el ligando y que este logre de forma efectiva estabilizar la conformación abierta e inactiva del mismo. Tanto los inhibidores **14–16** y **17**, así como los biciclos **10** desarrollados en esta tesis doctoral, no logran alcanzar la barrera del nanomolar a pesar de las numerosas modificaciones exploradas. Teniendo en cuenta esto, quizá la funcionalización de la posición C4

del sustrato natural permitiría al ligando ocupar más adecuadamente el hueco dinámico disponible en SQ-Mt. Esta hipótesis se estudió con los compuestos **18-20** (Figura 28C).

4.3.2 Síntesis del Compuesto 18

La síntesis del compuesto **18** se llevó a cabo en tres etapas a partir del alcohol **101**¹⁰² previamente descrito (Esquema 23). En primer lugar, oxidación del alcohol **101** por tratamiento con periodiniano de Dess Martin, y posterior tratamiento con bromuro de metilmagnesio a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, proporcionó el alcohol terciario **102** con un rendimiento global para los dos pasos del 48%. La desprotección en medio ácido de los éteres de silicio proporcionó de forma cuantitativa el diol **103**. Finalmente, la hidrólisis básica del éster **103** y posterior tratamiento con Amberlita IR-120 condujo al ácido deseado **18**.



Esquema 23. *Reactivos y condiciones:* (a) DMAP, TBAI, Et_3N , TBSCl, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a t.a. (b) Dess-Martin, DCM, t.a. (c) CH_3MgBr , THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ a t.a. (d) HCl/MeOH , t.a. (e) 1. LiOH (ac.), THF, t.a.; 2. Amberlita IR-120 (H^+). (f) DMP, CSA, t.a.

Inicialmente, la esteoquímica del centro cuaternario en **102** se estudió mediante experimentos NOE, sin embargo, como los estudios no resultaron concluyentes, esta

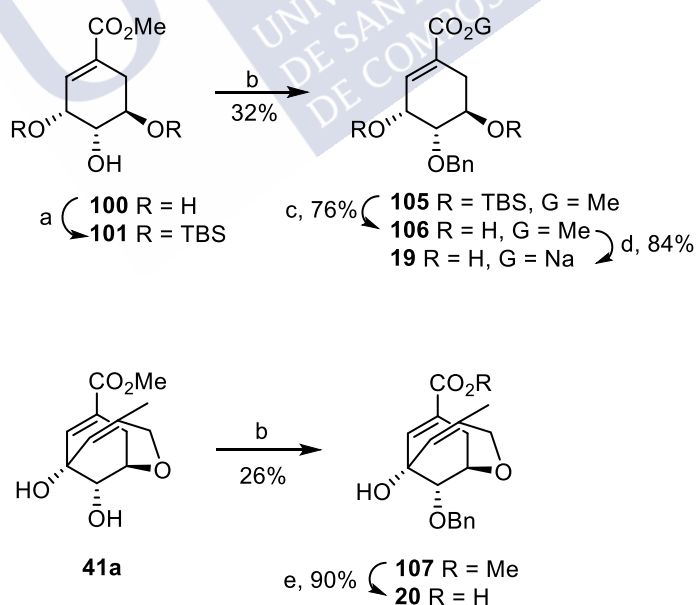
¹⁰² Gonzalez-Bello, C.; Coggins, J. R.; Hawkins, A. R.; Abell, C. J. *Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 8, 849–854.

se determinó en el acetal derivado **104** que posee una conformación más restringida. El acetal se obtuvo por tratamiento del diol **103** con 2,2-dimetoxipropano en medio ácido que posee una conformación más restringida. La irradiación del protón H3 en **104** proporcionó un incremento de la señal correspondiente al grupo metilo de 3.6%, lo que reveló que el grupo metilo y el protón H3 se encuentran por la misma cara.

El compuesto **18** no mostró buenas propiedades inhibitorias frente a los enzimas de siquimato quinasa provenientes de *M. tuberculosis* y *H. pylori* ya que, en ambos casos la K_i obtenida mediante los ensayos enzimáticos realizados resultó muy por encima de la constante de Michaelis.

4.3.3 Síntesis de los Compuestos 19 y 20

La síntesis del éter bencílico **19** se llevó a cabo en tres pasos a partir del alcohol **101**¹⁰² (Esquema 24).



Esquema 24. Reactivos y condiciones: (a) DMAP, TBAI, Et₃N, TBSCl, 0°C a t.a. (b) NaH, BnBr, THF, 0 °C. (c) TBAF, THF, 0 °C. (d) NaOH (ac.), THF, t.a. (e) 1. LiOH (ac.), THF, t.a. 2. Amberlita IR-120 (H⁺).

Así, el tratamiento del **101** con hidruro sódico y posterior reacción con bromuro de bencilo proporcionó el derivado bencílico **105** con un rendimiento del 32%.

Desprotección de los grupos TBS por tratamiento con fluoruro de tetrabutylamonio y posterior hidrólisis del éster metílico resultante como en casos anteriores condujo satisfactoriamente al compuesto objetivo **19**. Siguiendo una estrategia similar se sintetizó el compuesto **20** a partir del alcohol **41a**.

Los ensayos enzimáticos realizados de los compuestos **19** y **20** frente a los enzimas SQ-*Mt* y SQ-*Hp* revelaron que los compuestos no inhiben el enzima.





Capítulo 5. Parte Experimental



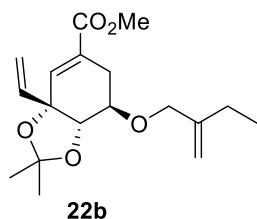
5.1 General Procedures: Methods and Equipment

All starting materials and reagents were commercially available and were used without further purification. ^1H NMR spectra (250, 300, 400 and 500 MHz) and ^{13}C NMR spectra (63, 75, 100 and 125 MHz) were measured in deuterated solvents. J values are given in Hertz. NMR assignments were carried out by a combination of 1D, COSY, and DEPT-135 experiments. FTIR spectra were recorded in a PerkinElmer Two FTIR spectrometer with attenuated total reference. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ values are given in $10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ g}^{-1}$. Milli-Q deionized water was used in all the buffers. Melting points were measured in a Büchi M-560 apparatus. All procedures involving the use of ion-exchange resins were carried out at room temperature using Milli-Q deionized water. Amberlite IR-120 (H^+) (cation exchanger) was washed successively with; (1) water, (2) NaOH (10%), (3) water, (4) HCl (10%), and (5) water, before use. DOWEX-50WX8-400 (NH_4^+) was prepared by treatment of commercially available ion-exchange DOWEX-50WX8-400 (H^+) successively with: (1) NaOH (10%); (2) Milli-Q water; (3) HCl (10%); (4) Milli-Q water; (5) ammonium acetate (15%); and (6) Milli-Q water, before use.

5.2 General procedure for synthesis of compounds 22

To a stirred solution of $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0.025 mmol) and dppb (0.1 mmol) in dry THF (0.8 mL), under argon and at room temperature, were added the alcohol **23**⁶⁰ (1 mmol), followed by a solution of the carbonates **24a–g** and **24i** (1.5 mmol) in dry THF (3 mL, 0.5 M). The resulting suspension was heated at 60 °C for 24 h and then cooled to room temperature. The mixture was filtered over Celite® and the residue was washed with diethyl ether. The filtrate and washings were evaporated under reduced pressure to yield an oil which was purified by flash chromatography to afford the allyl ethers **22**.

5.2.1 Methyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2-ethylallyloxy)-3,4-*O*-isopropylidenedioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (**22b**)



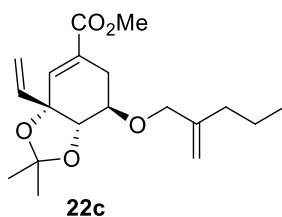
It was prepared following the general allylation procedure using **23**⁶⁰ (530 mg), Pd₂(dba)₃ (48 mg), dppb (89 mg), methyl (2-methylenebutyl) carbonate (**24b**)¹⁰³ (599 mg) in THF (8.3 mL), THF (9 mL). Eluent for chromatography =

(50:50) diethyl ether/hexane. Yield = 32% (213 mg). It was recovered 221 mg of starting material. Corrected yield = 74%. Colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = +99.1^\circ$ (c1.1, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.64 (t, $J = 1.3$ Hz, 1H, H2), 5.92 (dd, $J = 10.7$ and 17.3 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.45 (dd, $J = 1.5$ and 17.3 Hz, 1H, CH=CHH), 5.18 (dd, $J = 1.4$ and 10.7 Hz, 1H, CH=CHH), 4.95 (m, 1H, C=CHH), 4.87 (m, 1H, C=CHH), 4.09 (m, 1H, H5), 4.02 (m, 1H, H4), 3.99 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, OCHH), 3.92 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, OCHH), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 2.65 (dd, $J = 2.5$ and 17.9 Hz, 1H, CHH-6), 2.44 (ddd, $J = 2.8$, 3.8 and 18.0 Hz, 1H, CHH-6), 2.02 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH₂CH₃), 1.42 (s, 3H, CH₃), 1.34 (s, 3H, CH₃) and 1.02 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH₂CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 167.5 (C), 147.5 (C), 137.9 (CH), 137.7 (CH), 126.3 (C), 115.1 (CH₂), 110.3 (CH₂), 109.1 (C), 80.2 (C), 77.3 (CH), 73.2 (CH), 72.5 (CH₂), 52.0 (OCH₃), 28.0 (CH₃), 27.0 (CH₃), 25.9 (CH₂), 24.4 (CH₂) and 12.0 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 1710 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 345$ (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₈H₂₆O₅Na (MNa⁺): 345.1672; found, 345.1681.

5.2.2 Methyl (3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-*O*-isopropylidenedioxy-5-(2-propylallyloxy)-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (**22c**)

It was prepared following the general allylation procedure using **23**⁶⁰ (198 mg), Pd₂(dba)₃ (20 mg), dppb (33 mg), methyl (2-methylenepentyl) carbonate

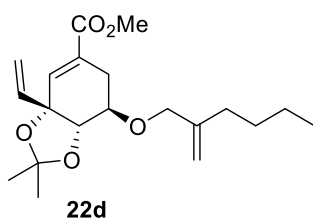
¹⁰³ Dai, Y.; Wu, F.; Zang, Z.; You, H.; Gong, H. *Chem. Eur. J.* 2012, **18**, 808-812.



(24c) (320 mg) in THF (2.3 mL), THF (3 mL). Eluent for chromatography = (20:80) diethyl ether/hexane. Yield = 47% (122 mg). Colorless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +92.8^\circ$ (c 1.1, CHCl_3).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.62 (t, $J = 1.4$ Hz, 1H, H2), 5.89 (dd, $J = 10.7$ and 17.4 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.42 (dd, $J = 1.5$ and 17.3 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHH}$), 5.14 (dd, $J = 1.5$ and 10.7 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHH}$), 4.93 (br s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 4.83 (br s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 4.06 (br d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H4), 4.00 (td, $J = 2.6$ and 3.9 Hz, 1H, H5), 3.94 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, OCHH), 3.87 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, OCHH), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 2.63 (dd, $J = 2.6$ and 18.0 Hz, 1H, CHH-6), 2.41 (ddd, $J = 2.8$, 3.8 and 18.0 Hz, 1H, CHH-6), 1.95 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 1.47–1.35 (m, 5H, CH_2+CH_3), 1.31 (s, 3H, CH_3) and 0.86 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH_2CH_3) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 167.5 (C), 145.8 (C), 137.9 (CH), 137.7 (CH), 126.3 (C), 115.0 (CH_2), 111.4 (CH_2), 109.1 (C), 80.2 (C), 77.4 (CH), 73.3 (CH), 72.3 (CH_2), 52.0 (OCH_3), 35.2 (CH_2), 28.0 (CH_3), 27.0 (CH_3), 24.4 (CH_2), 20.8 (CH_2) and 13.9 (CH_3) ppm. FTIR (ATR) ν : 1711 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 359$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{Na}$ (MNa^+): 359.1829; found, 359.1826.

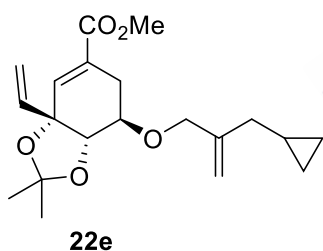
5.2.3 Methyl (3R,4S,5R)-3,4-O-isopropylidenedioxy-5-(2-butylallyloxy)-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (22d)



It was prepared following the general allylation procedure using **23**⁶⁰ (373 mg), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (38 mg), dppb (63 mg), methyl (2-methylenehexyl) carbonate (**24d**) (380 mg) in THF (4.4 mL), THF (6.4 mL). Eluent for chromatography = (10:90) diethyl ether/hexane. Yield = 49% (250 mg). Colorless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 105.9^\circ$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.64 (m, 1H, H2), 5.91 (dd, $J = 10.7$ and 17.3 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.44 (dd, $J = 1.5$ and 17.3 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHH}$), 5.17 (dd, $J = 1.5$ and 10.7 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHH}$), 4.94 (m, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 4.85 (m, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 4.08 (td, $J = 1.1$ and 4.0 Hz, 1H, H4), 4.01

(dt, $J = 2.5$ and 3.8 Hz, 1H, H5), 3.96 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, OCHH), 3.89 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, OCHH), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 2.64 (m, 1H, CHH-6), 2.43 (ddd, $J = 2.8$, 3.8 and 18.0 Hz, 1H, CHH-6), 1.99 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH₂(CH₂)₂CH₃), 1.43–1.23 (m, 4H, CH₂(CH₂)₂CH₃), 1.41 (s, 3H, CH₃), 1.33 (s, 3H, CH₃) and 0.88 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂(CH₂)₂CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 167.5 (C), 146.1 (C), 137.9 (CH), 137.7 (CH), 126.3 (C), 115.0 (CH₂), 111.2 (CH₂), 109.1 (C), 80.2 (C), 77.3 (CH), 73.2 (CH), 72.4 (CH₂), 52.0 (OCH₃), 32.8 (CH₂), 29.8 (CH₂), 28.0 (CH₃), 27.0 (CH₃), 24.4 (CH₂), 22.5 (CH₂) and 14.0 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 1717 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 373$ (MNa⁺). HRMS calcd for C₂₀H₃₀O₅Na (MNa⁺): 373.1985; found, 373.1982.

5.2.4 Methyl (3R,4S,5R)-5-(2-cyclopropylmethylallyloxy)-3,4-O-isopropylidenedioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (22e)

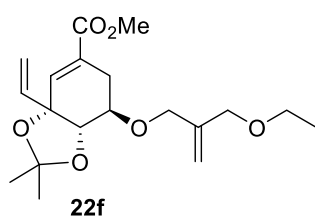


It was prepared following the general allylation procedure using **23**⁶⁰ (191 mg), Pd₂(dba)₃ (39 mg), dppb (64 mg), 2-(cyclopropylmethyl)allyl methyl carbonate (**24e**) (191 mg) in THF (2.2 mL), THF (3 mL).

Eluent for chromatography = (20:80) diethyl ether/hexane. Yield = 34% (89 mg). Colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = +93.8^\circ$ (c 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.64 (m, 1H, H2), 5.91 (dd, $J = 10.7$ and 17.3 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.44 (dd, $J = 1.4$ and 17.3 Hz, 1H, CH=CHH), 5.18 (dd, $J = 1.4$ and 10.7 Hz, 1H, CH=CHH), 5.01 (br s, 1H, C=CHH), 4.97 (br s, 1H, C=CHH), 4.07 (m, 1H, H5), 4.04–4.02 (m, 2H, H4+OCHH), 3.95 (br d, $J = 12.5$ Hz, 1H, OCHH), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 2.65 (dd, $J = 2.5$ and 18.0 Hz, 1H, CHH-6), 2.44 (ddd, $J = 2.8$, 3.8 and 18.0 Hz, 1H, CHH-6), 1.90 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH₂CH(CH₂)₂), 1.42 (s, 3H, CH₃), 1.34 (s, 3H, CH₃), 0.84–0.70 (m, 1H, CH₂CH(CH₂)₂), 0.50–0.44 (m, 2H, CH₂CHCH₂CH₂) and 0.08–0.03 (m, 2H, CH₂CHCH₂CH₂) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.6 (C), 146.1 (C), 138.0 (CH), 137.8 (CH), 126.4 (C), 115.2 (CH₂),

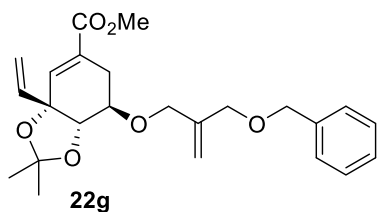
111.6 (CH₂), 109.2 (C), 80.3 (C), 77.5 (CH), 73.3 (CH), 72.6 (CH₂), 52.1 (OCH₃), 38.2 (CH₂), 28.1 (CH₃), 27.1 (CH₃), 24.4 (CH₂), 9.3 (CH), 4.8 (CH₂) and 4.7 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 1717 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 371 (MNa⁺). HRMS calcd for C₂₀H₂₈O₅Na (MNa⁺): 371.1829; found, 371.1825.

5.2.5 Methyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-[(2-(ethoxymethyl)allyloxy]-3,4-*O*-isopropilidendioxi-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (22f)



It was prepared following the general allylation procedure using **23**⁶⁰ (255 mg), Pd₂(dba)₃ (26 mg), dppb (43 mg), 2-(ethoxymethyl)allyl methyl carbonate (**24f**) (209 mg) in tetrahydrofuran (2.4 mL), tetrahydrofuran (4.3 mL). Eluent for chromatography = (20:80) diethyl ether/hexane. Yield = 54% (190 mg). Colorless oil. $[\alpha]_D^{20}$ = +85.2° (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.63 (t, J = 1.2 Hz, 1H, H₂), 5.89 (dd, J = 10.7 and 17.3 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.43 (dd, J = 1.4 and 17.3 Hz, 1H, CH=CHH), 5.16 (dd, J = 1.4 and 10.7 Hz, 1H, CH=CHH), 5.12 (m, 2H, C=CH₂), 4.08–3.96 (m, 4H, H₄+H₅+OCH₂), 3.91 (br s, 2H, CH₂OEt), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.44 (q, J = 7.0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2.64 (dd, J = 2.5 and 18.0 Hz, 1H, CHH-6), 2.43 (ddd, J = 2.8, 3.7 and 18.0 Hz, 1H, CHH-6), 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.32 (s, 3H, CH₃) and 1.18 (t, J = 7.0 Hz, 3H, OCH₂CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.5 (C), 142.9 (C), 137.9 (CH), 137.7 (CH), 126.3 (C), 115.1 (CH₂), 113.9 (CH₂), 109.2 (C), 80.2 (C), 77.4 (CH), 73.7 (CH), 71.4 (CH₂), 70.3 (CH₂), 65.9 (CH₂), 52.0 (OCH₃), 28.0 (CH₃), 27.0 (CH₃), 24.5 (CH₂) and 15.3 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 1716 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 375 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₉H₂₈O₆Na (MNa⁺): 375.1778; found, 375.1777.

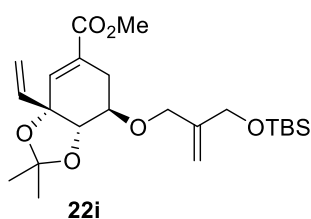
5.2.6 Methyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-[(2-(benzyloxymethyl)allyloxy]-3,4-*O*-isopropilidendioxi-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (22g)



It was prepared following the general allylation procedure using **23**⁶⁰ (217 mg), Pd₂(dba)₃ (22 mg), dppb (37 mg), 2-(benzyloxymethyl)allyl methyl carbonate (**24g**) (242 mg) in tetrahydrofuran (2.1 mL), tetrahydrofuran (3.7 mL). Eluent for chromatography = (50:50) diethyl ether/hexane. Yield = 63% (207 mg). Yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = +85.9^\circ$ (c0.8, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.38–7.28 (m, 5H, 5×ArH), 6.65 (t, $J = 1.3$ Hz, 1H, H₂), 5.89 (dd, $J = 10.7$ and 17.3 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.43 (dd, $J = 1.4$ and 17.3 Hz, 1H, CH=CHH), 5.18–5.14 (m, 3H, CH=CHH+C=CH₂), 4.49 (s, 2H, OCH₂), 4.12–4.02 (m, 4H, H₄+H₅+CH₂OBn), 3.99 (br s, 2H, OCH₂Ph), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 2.65 (dd, $J = 2.5$ and 18.0 Hz, 1H, CHH-6), 2.45 (ddd, $J = 2.8, 3.7$ and 18.0 Hz, 1H, CHH-6), 1.42 (s, 3H, CH₃) and 1.34 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.5 (C), 142.6 (C), 138.3 (C), 137.9 (CH), 137.7 (CH), 128.5 (2×CH), 127.8 (2×CH), 127.8 (CH), 126.3 (C), 115.2 (CH₂), 114.3 (CH₂), 109.2 (C), 80.2 (C), 77.4 (CH), 73.7 (CH), 72.3 (CH₂), 70.9 (CH₂), 70.3 (CH₂), 52.0 (OCH₃), 28.0 (CH₃), 27.0 (CH₃) and 24.5 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 1709 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 437$ (MNa⁺). HRMS calcd for C₂₄H₃₀O₆Na (MNa⁺): 437.1935; found, 437.1936.

5.2.7 Methyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-[(2-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl)allyloxy]-3,4-*O*-isopropilidendioxi-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (22i)



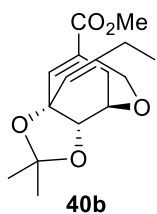
It was prepared following the general allylation procedure using **23**⁶⁰ (96 mg), Pd₂(dba)₃ (10 mg), dppb (16 mg), 2-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl)allyl methyl carbonate (**24i**) (118 mg) in THF (1 mL), THF (1.6

mL). Eluent for chromatography = (25:75) diethyl ether/hexane. Yield = 43% (72 mg). Colorless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +63.2^\circ$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 6.63 (br s, 1H, H2), 5.89 (dd, $J = 10.7$ and 17.3 Hz, 1H, $\text{HC}=\text{CH}_2$), 5.43 (dd, $J = 1.4$ and 17.3 Hz, 1H, $\text{HC}=\text{CHH}$), 5.18–5.14 (m, 2H, $\text{HC}=\text{CHH}+\text{C}=\text{CHH}$), 5.04 (br s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 4.10 (br s, 2H, OCH_2), 4.07–3.94 (m, 4H, $\text{H}_4+\text{H}_5+\text{CH}_2\text{OTBS}$), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 2.63 (dd, $J = 1.9$ and 18.0 Hz, 1H, $\text{CHH}-6$), 2.42 (dt, $J = 3.3$ and 18.0 Hz, 1H, $\text{CHH}-6$), 1.40 (s, 3H, CH_3), 1.33 (s, 3H, CH_3), 0.89 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) and 0.04 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 167.5 (C), 145.0 (C), 137.9 (CH), 137.7 (CH), 126.3 (C), 115.2 (CH_2), 112.0 (CH_2), 109.2 (C), 80.2 (C), 77.3 (CH), 73.3 (CH), 70.2 (CH_2), 63.9 (CH_2), 52.1 (OCH_3), 28.0 (CH_3), 27.0 (CH_3), 26.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.4 (CH_2), 18.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) and -5.3 ($2\times\text{CH}_3$) ppm. FTIR (ATR) ν : 1716 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 461$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{SiNa}$ (MNa^+): 461.2330; found, 461.2330.

5.3 General procedure for ring-closing metathesis (RCM) of compounds 40a–g and i.

A solution of compounds **22a–g** and **22i** (1 mmol) and 2nd generation Grubbs' catalyst (0.02 mmol) in dry toluene (20 mM), under an inert atmosphere, was heated at 90 °C for 24 – 48 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtered over Celite® and the residue was washed with diethyl ether. The filtrate and the washings were concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography to yield the bicycles **40a–g** and **40i**.

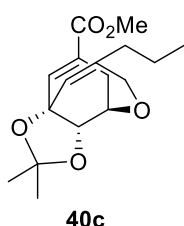
5.3.1 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-4-ethyl-6,10-*O*-isopropylidenedioxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (40b)



It was prepared following the general RCM procedure using **22b** (190 mg), 2nd generation Grubbs' catalyst (7 mg), toluene (30 mL). Eluent for chromatography = (30:70) diethyl ether/hexane. Reaction time = 48 h. Yield = 47% (82 mg). It was also recovered

95 mg of starting material. Corrected yield = 97%. Colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = +30.8^\circ$ (*c*1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.67 (m, 1H, H7), 5.63 (m, 1H, H5), 4.46 (m, 1H, H1), 4.35-4.26 (m, 2H, H10+OCHH-3), 3.99 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, OCHH-3), 3.70 (m, 3H, OCH₃), 2.51 (m, 2H, CH₂-9), 1.93 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1.37 (s, 3H, CH₃), 1.30 (s, 3H, CH₃) and 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₂CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.5 (C), 145.4 (C), 138.0 (CH), 125.0 (C), 122.1 (CH), 110.0 (C), 80.0 (C), 75.0 (CH), 70.2 (CH), 67.3 (CH₂), 51.9 (OCH₃), 28.6 (CH₂), 28.1 (CH₃), 27.3 (CH₃), 27.2 (CH₂) and 12.0 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 1712 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) *m/z* = 317 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₆H₂₂O₅Na (MNa⁺): 317.1359; found, 317.1359.

5.3.2 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-6,10-*O*-isopropylidenedioxy-4-propyl-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (40c)

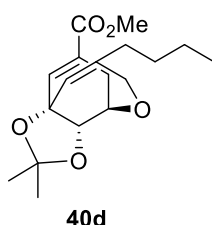


It was prepared following the general RCM procedure using **22c** (162 mg), 2nd generation Grubbs' catalyst (6 mg), toluene (24 mL). Eluent for chromatography = (20:80) diethyl ether/hexane. Reaction time = 48 h. Yield = 63% (94 mg). It was

also recovered 43 mg of starting material. Corrected yield = 89%. Colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = +32.0^\circ$ (*c*1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.69 (m, 1H, H7), 5.67 (m, 1H, H5), 4.48 (m, 1H, H1), 4.36 (dd, *J* = 1.6 and 6.6 Hz, 1H, H10), 4.29 (dd, *J* = 1.9 and 16.7 Hz, 1H, OCHH-3), 4.01 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H, OCHH-3), 3.73 (m, 3H, OCH₃), 2.53 (m, 2H, CH₂-9), 1.92 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₃),

1.44–1.36 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3 + \text{CH}_3$), 1.33 (s, 3H, CH_3) and 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 167.5 (C), 143.8 (C), 137.9 (CH), 125.0 (C), 123.3 (CH), 110.0 (C), 79.9 (C), 74.9 (CH), 70.2 (CH), 67.3 (CH_2), 51.9 (OCH_3), 38.0 (CH_2), 28.1 (CH_3), 27.2 (CH_3), 27.2 (CH_2), 20.8 (CH_2) and 13.8 (CH_3) ppm. FTIR (ATR) ν : 1717 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 331$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{Na}$ (MNa^+): 331.1516; found, 331.1513.

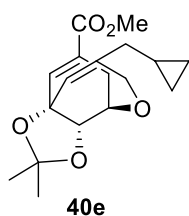
5.3.3 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-4-butyl-6,10-*O*-isopropylidenedioxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (40d)



It was prepared following the general RCM procedure using **22d** (110 mg), 2nd generation Grubbs' catalyst (4 mg), toluene (16 mL). Eluent for chromatography = (15:85) diethyl ether/hexane. Reaction time = 24 h. Yield = 54% (54 mg).

Colorless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 37.5^\circ$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.68 (m, 1H, H7), 5.65 (br s, 1H, H5), 4.47 (m, 1H, H1), 4.34 (dd, $J = 1.7$ and 5.0 Hz, 1H, H10), 4.29 (dd, $J = 2.2$ and 16.7 Hz, 1H, OCHH-3), 4.00 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H, OCHH-3), 3.72 (m, 3H, OCH_3), 2.52 (m, 2H, CH_2 -9), 1.92 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 1.38 (s, 3H, CH_3), 1.36–1.21 (m, 4H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 1.31 (s, 3H, CH_3) and 0.87 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 167.6 (C), 144.1 (C), 138.0 (CH), 125.0 (C), 123.1 (CH), 110.1 (C), 79.9 (C), 75.0 (CH), 70.2 (CH), 67.4 (CH_2), 51.9 (OCH_3), 35.7 (CH_2), 29.8 (CH_2), 28.1 (CH_3), 27.3 (CH_3), 27.2 (CH_2), 22.5 (CH_2) and 14.0 (CH_3) ppm. FTIR (ATR) ν : 1717 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 345$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_5\text{Na}$ (MNa^+): 345.1672; found, 345.1670.

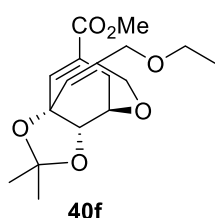
5.3.4 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-4-cyclopropylmethyl-6,10-*O*-isopropylidenedioxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (40e)



It was prepared following the general RCM procedure using **22e** (105 mg), 2nd generation Grubbs' catalyst (19 mg), toluene (15 mL). Eluent for chromatography = (20:80) diethyl ether/hexane. Reaction time = 48 h. Yield = 45% (43 mg). It was

also recovered 59 mg of starting material. Corrected yield = quant. Colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = +30.5^\circ$ (c1.1, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.69 (m, 1H, H7), 5.82 (m, 1H, H5), 4.48 (m, 1H, H1), 4.38–4.30 (m, 2H, H10+OCHH-3), 4.05 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H, OCHH-3), 3.72 (m, 3H, OCH₃), 2.52 (m, 2H, CH₂-9), 1.90 (dd, $J = 6.4$ and 15.8 Hz, 1H, CHH), 1.77 (dd, $J = 7.0$ and 15.9 Hz, 1H, CHH), 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.32 (s, 3H, CH₃), 0.71 (m, 1H, CH₂CH(CH₂)₂), 0.50–0.45 (m, 2H, CHCH₂CH₂) and 0.06–0.03 (m, 2H, CHCH₂CH₂) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.6 (C), 144.0 (C), 138.1 (CH), 125.1 (C), 123.2 (CH), 110.1 (C), 80.0 (C), 75.0 (CH), 70.3 (CH), 67.4 (CH₂), 52.0 (OCH₃), 40.5 (CH₂), 28.1 (CH₃), 27.3 (CH₃), 27.3 (CH₃), 9.0 (CH), 4.8 (CH₂) and 4.7 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 1718 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 343$ (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₈H₂₄O₅Na (MNa⁺): 343.1516; found, 343.1524.

5.3.5 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-4-(ethoxymethyl)-6,10-*O*-isopropylidenedioxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (40f)



It was prepared following the general RCM procedure using **22f** (251 mg), 2nd generation Grubbs' catalyst (9 mg), toluene (23 mL). Reaction time = 48 h. Eluent for chromatography = (20:80) diethyl ether/hexane. Yield = 16% (36 mg). It was also

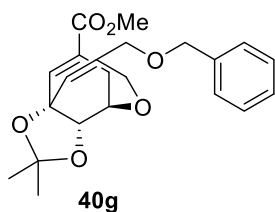
recovered 156 mg of starting material. Corrected yield = 78%. Yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = +36.9^\circ$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.68 (m, 1H, H7), 5.95 (m,

1H, H5), 4.51 (m, 1H, H1), 4.40 (dd, $J = 1.4$ and 4.8 Hz, 1H, H10), 4.32 (dd, $J = 1.5$ and 16.7 Hz, 1H, OCHH-3), 4.16 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H, OCHH-3), 3.84 (sa, 2H, CH₂OEt), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.43 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H, OCH₂CH₃), 2.55 (m, 2H, CH₂-9), 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.33 (s, 3H, CH₃) and 1.18 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.5 (C), 140.6 (C), 137.4 (CH), 125.9 (CH), 125.6 (C), 110.3 (C), 79.6 (C), 74.8 (CH), 73.1 (CH₂), 70.3 (CH), 66.0 (CH₂), 65.0 (CH₂), 52.0 (OCH₃), 28.1 (CH₃), 27.3 (CH₃), 27.2 (CH₂) and 15.2 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 1695 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 347$ (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₇H₂₄O₆Na (MNa⁺): 347.1465; found, 347.1466.

5.3.5.1 Preparation of **40f** from **40i**.

A solution of the alcohol **40i** (34 mg, 0.10 mmol) in dry DMF (0.2 mL), at 0 °C and under argon, was treated with NaH (6.6 mg, 0.17 mmol, *ca* 60% w/w in mineral oil). After 30 min stirring, bromoethane (20 μ L, 0.17 mmol) was added, the ice bath was removed and the reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature. The reaction mixture was diluted with a mixture of (4:1) water/ethyl acetate, the organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate keeping the same proportion. The combined organic extracts were dried (anh. Na₂SO₄), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with (50:50) ethyl acetate/hexane, to give compound **40f** (12 mg, 31%). It was also recovered 4 mg of starting material. Corrected yield = 57%.

5.3.6 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-4-(benzyloxymethyl)-6,10-*O*-isopropylidenedioxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (**40g**)



It was prepared following the general RCM procedure using **22g** (202 mg), 2nd generation Grubbs' catalyst (7 mg), toluene (27 mL). Reaction time = 48 h. Eluent for chromatography = (20:80) diethyl ether/hexane. Yield =

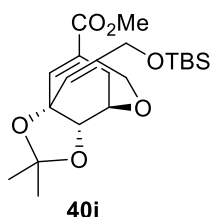
26% (53 mg). It was also recovered 138 mg of starting material. Corrected yield = 94%. Yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = +22.3^\circ$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.37–7.26 (m, 5H, 5 \times ArH), 6.69 (m, 1H, H7), 5.98 (br s, 1H, H5), 4.51 (m, 1H, H1), 4.46 (s, 2H, CH_2Ph), 4.39 (dd, $J = 1.5$ and 4.8 Hz, 1H, H10), 4.33 (dd, $J = 1.4$ and 16.8 Hz, 1H, OCHH-3), 4.18 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H, OCHH-3), 3.89 (sa, 2H, CH_2OBn), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 2.55 (m, 2H, CH_2 -9), 1.41 (s, 3H, CH_3) and 1.34 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 167.5 (C), 140.4 (C), 137.9 (C), 137.3 (CH), 128.6 (2 \times CH), 127.9 (3 \times CH), 126.5 (CH), 125.7 (C), 110.3 (C), 79.6 (C), 74.8 (CH), 72.6 (CH_2), 72.5 (CH_2), 70.3 (CH), 65.1 (CH_2), 52.0 (OCH_3), 28.1 (CH_3), 27.3 (CH_3) and 27.2 (CH_2) ppm. FTIR (ATR) ν : 1716 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 409$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{Na}$ (MNa^+): 409.1622; found, 409.1619.

5.3.6.1 Preparation of **40g** from **40i**

A solution of the alcohol **40i** (31 mg, 0.10 mmol) in dry THF (0.3 mL), at 0 °C and under argon, was treated with NaH (6 mg, 0.15 mmol, *ca* 60% w/w in mineral oil). After 30 min stirring, benzyl bromide (20 μL , 0.15 mmol) was added, the ice bath was removed and the reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature. Saturated NH_4Cl was added, the organic solvent was removed under reduced pressure and the aqueous solution was extracted with ethyl acetate ($\times 3$). The combined organic extracts were dried (anh. Na_2SO_4), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting

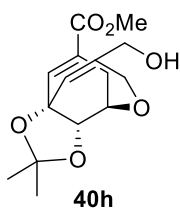
residue was purified by flash chromatography, eluting with (25:75) ethyl acetate/hexane, to give compound **40g** (25 mg, 64%).

5.3.7 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-4-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl)-6,10-*O*-isopropylidenedioxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (**40i**)



It was prepared following the general RCM procedure using **22i** (133 mg), 2nd generation Grubbs' catalyst (9 mg), toluene (15 mL). Reaction time = 48 h. Eluent for chromatography = (20:80) diethyl ether/hexane. Yield = 42% (52 mg). Colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = +33.9^\circ$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.68 (m, 1H, H7), 5.92 (m, 1H, H5), 4.51 (m, 1H, H1), 4.39 (dd, $J = 1.6$ and 4.8 Hz, 1H, H10), 4.28 (dd, $J = 1.4$ and 16.7 Hz, 1H, OCHH-3), 4.08 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H, OCHH-3), 4.01 (dd, $J = 1.3$ and 4.6 Hz, 2H, CH₂), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 2.54 (m, 2H, CH₂-9), 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.33 (s, 3H, CH₃), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.05 (s, 3H, CH₃) and 0.05 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.5 (C), 142.7 (C), 137.6 (CH), 125.4 (C), 123.3 (CH), 110.2 (C), 79.8 (C), 74.9 (CH), 70.3 (CH), 65.3 (CH₂), 64.7 (CH₂), 52.0 (OCH₃), 28.1 (CH₃), 27.2 (CH₃), 27.2 (CH₂), 26.0 (C(CH₃)₃), 18.5 (C(CH₃)₃), -5.2 (CH₃) and -5.2 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 1716 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 433$ (MNa⁺). HRMS calcd for C₂₁H₃₄O₆SiNa (MNa⁺): 433.2017; found, 433.2013.

5.4 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-4-(hydroxymethyl)-6,10-*O*-isopropylidenedioxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (**40h**)



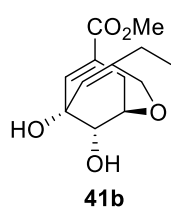
A solution of silyl ether **40i** (53 mg, 0.13 mmol) in dry THF (1.3 mL), at 0 °C and under inert atmosphere, was treated with TBAF (0.5 mL, *ca* 1 M in THF). The reaction mixture was stirred for 50 min and then diluted with ethyl acetate. The organic solution was washed with water (×2), NaHCO₃ (sat) (×2), dried (anh. Na₂SO₄), filtered

and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with (50:50) diethyl ether/hexane, to give the alcohol **40h** (31 mg, 81%) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = +37.1^\circ$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.68 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, H7), 5.97 (br s, 1H, H5), 4.52 (m, 1H, H1), 4.40–4.32 (m, 2H, H10+OCHH-3), 4.18 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H, OCHH), 4.02 (t, $J = 4.3$ Hz, 2H, CH_2), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 2.55 (m, 2H, CH_2 -9), 1.40 (s, 3H, CH_3) and 1.34 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 167.3 (C), 142.9 (C), 137.2 (CH), 125.5 (C), 124.4 (CH), 110.2 (C), 79.5 (C), 74.6 (CH), 70.2 (CH), 65.0 (CH_2), 64.5 (CH_2), 51.9 (CH_3), 28.0 (CH_3), 27.1 (CH_3) and 27.0 (CH_2) ppm. FTIR (ATR) ν : 3441 (OH) and 1709 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 319$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{Na}$ (MNa^+): 319.1152; found, 319.1152.

5.5 General procedure for the acetal deprotection in **40a–h**

A solution of the acetals **40a–h** (1 mmol) in methanol (7 mL) and aqueous HCl (8.6 mL, 6 M) was heated at 60 °C for 6 h. The mixture was cooled and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography to yield the diols **41a–h**.

5.5.1 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-4-ethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (**41b**)

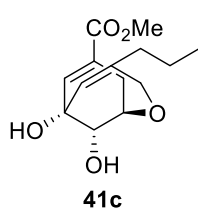


It was prepared following the general deprotection procedure using **40b** (128 mg), HCl (0.7 mL) and methanol (2.9 mL). Eluent for chromatography = ethyl acetate. Yield = 91% (99 mg).

Colorless oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.69 (m, 1H, H7), 5.47 (dd, $J = 1.6$ and 3.5 Hz, 1H, H5), 4.33 (quint, $J = 2.6$ Hz, 1H, H1), 4.21–4.15 (m, 2H, H10+OCHH-3), 3.92 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, OCHH-3), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.00 (br s, 2H, 2 \times OH), 2.61 (td, $J = 2.9$ and 18.3 Hz, 1H, CHH-9), 2.40 (dd, $J = 2.0$ and 18.3 Hz, 1H, CHH-9), 1.97 (qd, $J = 1.2$ and 7.4 Hz, 2H, CH_2CH_3) and 0.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 167.8 (C), 145.3 (C),

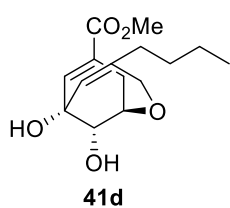
138.8 (CH), 127.4 (C), 125.7 (CH), 73.3 (CH), 72.0 (C), 69.8 (CH), 66.3 (CH₂), 52.1 (OCH₃), 29.0 (CH₂), 27.2 (CH₂) and 12.2 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3395 (OH) and 1701 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 277 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₃H₁₈O₅Na (MNa⁺): 277.1046; found, 277.1044.

5.5.2 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-6,10-dihydroxy-4-propyl-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (41c)



It was prepared following the general deprotection procedure using **40c** (122 mg), HCl (0.7 mL) and methanol (2.6 mL). Reaction time = 18 h. Eluent for chromatography = (80:20) diethyl ether/hexane. Yield = 80% (87 mg). Colorless oil. $[\alpha]_D^{20}$ = -48.1° (*c*1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.69 (br s, 1H, H7), 5.48 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H5), 4.32 (m, 1H, H1), 4.20–4.14 (m, 2H, H10+OCHH-3), 3.93 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, OCHH-3), 3.72 (m, 3H, OCH₃), 3.07 (br s, 2H, 2×OH), 2.61 (dt, *J* = 2.9 and 18.3 Hz, 1H, CHH-9), 2.40 (dd, *J* = 1.7 and 18.2 Hz, 1H, CHH-9), 1.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1.38 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃) and 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, (CH₂)₂CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.8 (C), 143.6 (C), 138.8 (CH), 127.3 (C), 127.0 (CH), 73.3 (CH), 72.0 (C), 69.7 (CH), 66.2 (CH₂), 52.0 (OCH₃), 38.6 (CH₂), 27.2 (CH₂), 21.0 (CH₂) and 13.8 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3412 (OH) and 1700 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 291 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₄H₂₀O₅Na (MNa⁺): 291.1203; found, 291.1202.

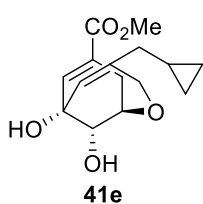
5.5.3 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-4-butyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (41d)



It was prepared following the general deprotection procedure using **40d** (124 mg), HCl (0.7 mL) and methanol (3 mL). Reaction time = 6 h. Eluent for chromatography = (90:10) diethyl ether/hexane. Yield = 89% (95 mg). Colorless oil. $[\alpha]_D^{20}$ = -42.3° (*c*1.0, CH₃OH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 6.68 (br s, 1H,

H7), 5.48 (br s, 1H, H5), 4.31–4.26 (m, 2H, H1+OCHH-3), 4.16 (br d, $J = 4.8$ Hz, 1H, H10), 3.94 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, OCHH-3), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 2.63 (td, $J = 2.8$ and 18.0 Hz, 1H, CHH-9), 2.32 (br d, $J = 18.5$ Hz, 1H, CHH-9), 2.02 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH₂(CH₂)₂CH₃), 1.44–1.34 (m, 4H, CH₂(CH₂)₂CH₃) and 0.95 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, (CH₂)₃CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 169.2 (C), 144.1 (C), 140.9 (CH), 128.9 (CH), 127.8 (C), 75.1 (CH), 72.5 (C), 70.5 (CH), 66.8 (CH₂), 52.3 (OCH₃), 37.2 (CH₂), 31.1 (CH₂), 28.2 (CH₂), 23.3 (CH₂) and 14.3 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3419 (OH) and 1710 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 305$ (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₅H₂₂O₅Na (MNa⁺): 305.1359; found, 305.1357.

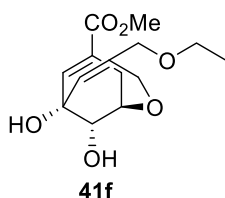
5.5.4 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-4-cyclopropylmethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (**41e**)



It was prepared following the general deprotection procedure using **40e** (160 mg), HCl (0.8 mL) and methanol (3.3 mL). Reaction time = 18 h. Eluent for chromatography = (90:10) diethyl ether/hexane. Yield = 76% (107 mg). White solid. Mp:

128.2–128.7 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -44.4^\circ$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.74 (m, 1H, H7), 5.66 (m, 1H, H5), 4.38 (m, 1H, H1), 4.28–4.22 (m, 2H, OCHH-3+H10), 4.01 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, OCHH-3), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 2.65 (dt, $J = 3.0$ and 18.3 Hz, 1H, CHH-9), 2.45 (dd, $J = 2.1$ and 18.3 Hz, 1H, CHH-9), 1.88 (m, 2H, CH₂), 0.78–0.65 (m, 1H, CH₂CH(CH₂)₂), 0.52–0.46 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 0.07 (dd, $J = 1.3$ and 5.0 Hz, 1H, CHCH₂CHH) and 0.04 (dd, $J = 1.4$ and 4.7 Hz, 1H, CHCH₂CHH) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.8 (C), 143.7 (C), 138.8 (CH), 127.3 (C), 126.8 (CH), 73.3 (CH), 72.0 (C), 69.7 (CH), 66.3 (CH₂), 52.0 (OCH₃), 41.0 (CH₂), 27.2 (CH₂), 9.1 (CH), 4.8 (CH₂) and 4.7 (CH₂) ppm. FTIR (ATR): 3393 (OH) and 1685 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 303$ (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₅H₂₀O₅Na (MNa⁺): 303.1203; found, 303.1200.

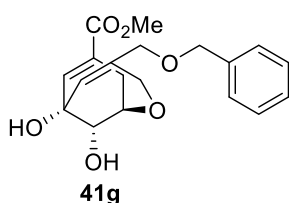
5.5.5 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-4-ethoxymethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (41f)



It was prepared following the general deprotection procedure using **40f** (49 mg), HCl (0.3 mL) and methanol (1 mL). Reaction time = 11 h. Eluent for chromatography = (70:30) ethyl acetate/hexane. Yield = 80% (34 mg). Brown oil.

$[\alpha]_D^{20} = -35.1^\circ$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.70 (br s, 1H, H7), 5.77 (br s, 1H, H5), 4.38 (q, $J = 2.3$ Hz, 1H, H1), 4.24–4.19 (m, 2H, H10+OCHH-3), 4.08 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H, OCHH-3), 3.85 (br s, 2H, CH_2OEt), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.44 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 2.65 (dt, $J = 2.9$ and 18.4 Hz, 1H, CHH-9), 2.45 (br d, $J = 17.9$ Hz, 1H, CHH-9) and 1.18 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 167.6 (C), 140.2 (C), 138.1 (CH), 129.7 (CH), 127.9 (C), 73.5 (CH), 73.4 (CH_2), 71.8 (C), 69.6 (CH), 66.1 (CH_2), 64.0 (CH_2), 52.1 (OCH_3), 27.2 (CH_2) and 15.2 (CH_3) ppm. FTIR (ATR) ν : 3406 (OH) and 1709 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 307$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{Na}$ (MNa^+): 307.1152; found, 307.1153.

5.5.6 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-4-benzyloxymethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (41g)

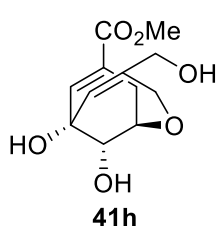


It was prepared following the general deprotection procedure using **40g** (55 mg), HCl (0.2 mL) and methanol (0.9 mL). Reaction time = 12 h. Eluent for chromatography = diethyl ether. Yield = 85% (41 mg).

Colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = -24.2^\circ$ (c 1.0, MeOH). ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 7.39–7.27 (m, 5H, $5 \times \text{ArH}$), 6.69 (m, 1H, H7), 5.77 (m, 1H, H5), 4.48 (br s, 2H, CH_2Ph), 4.33–4.27 (m, 2H, H1+OCHH-3), 4.20 (dd, $J = 1.4$ and 4.9 Hz, 1H, H10), 4.08 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, OCHH-3), 3.94 (s, 2H, CH_2OBn), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 2.65 (dt, $J = 2.9$ and 18.1 Hz, 1H, CHH-9) and 2.28 (m, 1H, CHH-9) ppm. ^{13}C

NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 169.2 (C), 140.6 (C), 140.3 (CH), 139.4 (C), 132.3 (CH), 129.4 (2 \times CH), 129.0 (2 \times CH), 128.7 (CH), 128.4 (C), 75.3 (CH), 73.8 (CH₂), 73.0 (CH₂), 72.4 (C), 70.3 (CH), 64.6 (CH₂), 52.3 (OCH₃) and 28.2 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3406 (OH) and 1709 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 369 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₉H₂₂O₆Na (MNa⁺): 369.1309; found, 369.1307.

5.5.7 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-4-hydroxymethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylate (**41h**)



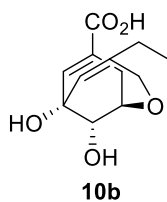
It was prepared following the general deprotection procedure using **40h** (81 mg), HCl (0.3 mL) and methanol (1.8 mL). Reaction time = 8 h. Eluent for chromatography = ethyl acetate. Yield = 95% (66 mg). Colorless oil. $[\alpha]_D^{20}$ = -147.5°

(c0.8, MeOH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 6.65 (br s, 1H, H7), 5.69 (br s, 1H, H5), 4.29–4.24 (m, 2H, H1+OCHH-3), 4.16 (m, 1H, H10), 4.01 (d, J = 16.4 Hz, 1H, OCHH-3), 3.95 (d, J = 13.5 Hz, 1H, CHH-OH), 3.89 (d, J = 13.5 Hz, 1H, CHH-OH), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 2.60 (dt, J = 2.8 and 18.0 Hz, 1H, CHH-9) and 2.29 (d, J = 18.0 Hz, 1H, CHH-9) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 169.2 (C), 143.4 (C), 140.5 (CH), 129.6 (CH), 128.2 (C), 75.2 (CH), 72.4 (C), 70.3 (CH), 65.5 (CH₂), 64.4 (CH₂), 52.3 (OCH₃) and 28.2 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3372 (OH) and 1697 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 279 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₂H₁₆O₆Na (MNa⁺): 279.0839; found, 279.0838.

5.6 General procedure for the ester hydrolysis in **41a–h**

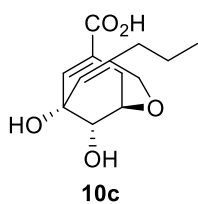
A solution of the esters **41a–h** (1 mmol) in THF (10 mL) was treated at room temperature with an aqueous solution of LiOH (1.2 mL, 2.5 M). After stirring for 1 h, water was added and THF was removed under reduced pressure. The aqueous layer was washed with ethyl acetate ($\times 3$) and then treated with Amberlite IR-120 (H⁺) until pH 6. The resin was filtered off and washed with MilliQ water. The filtrate and the washings were lyophilized to give acids **10**.

5.6.1 (1*R*,6*S*,10*S*)-4-ethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylic acid (**10b**)



It was prepared following the general basic hydrolysis procedure using **41b** (39 mg), LiOH (0.18 mL) and THF (1.5 mL). Yield = 99% (35 mg). White solid. Mp: 216 °C (dec.). $[\alpha]_D^{20} = -24.7^\circ$ (c1.0, MeOH). ^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ : 6.57 (s, 1H, H7), 5.36 (m, 1H, H5), 4.23–4.17 (m, 2H, H1+OCHH), 4.07 (dd, $J = 1.2$ and 4.8 Hz, 1H, H10), 3.81 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, OCHH), 2.49 (dt, $J = 2.8$ and 18.1 Hz, 1H, CHH-9), 2.18 (dd, $J = 1.3$ and 18.0 Hz, 1H, CHH-9), 1.89 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2) and 0.91 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ : 170.8 (C), 145.5 (C), 140.8 (CH), 128.1 (C), 127.8 (CH), 75.2 (CH), 72.6 (C), 70.4 (CH), 66.8 (CH_2), 29.9 (CH_2), 28.2 (CH_2) and 12.7 (CH_3) ppm. FTIR (ATR) ν : 3365 (OH) and 1688 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 240$ (M-H). HRMS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_5$ (M-H): 239.0925; found, 239.0921.

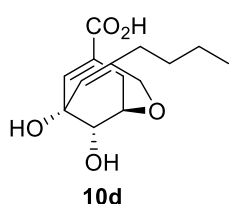
5.6.2 (1*R*,6*S*,10*S*)-6,10-dihydroxy-4-propyl-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylic acid (**10c**)



It was prepared following the general basic hydrolysis procedure using **41c** (58 mg), LiOH (0.9 mL) and THF (2.2 mL). Yield = 99% (55 mg). White foam. $[\alpha]_D^{20} = -38.1^\circ$ (c1.0, H_2O). ^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ : 6.72 (br s, 1H, H7), 5.47 (br s, 1H, H5), 4.38–4.27 (m, 3H, H1+H10+OCHH-3), 3.93 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H, OCHH-3), 2.56 (br d, $J = 18.6$ Hz, 1H, CHH-9), 2.29 (d, $J = 18.5$ Hz, 1H, CHH-9), 1.95 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.35 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) and 0.82 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ : 173.2 (C), 146.4 (C), 141.9 (CH), 129.6 (C), 129.1 (CH), 75.8 (CH), 74.3 (C), 71.1 (CH), 68.0 (CH_2), 40.4 (CH_2), 29.2 (CH_2), 22.9 (CH_2) and 15.4 (CH_3) ppm. FTIR (ATR) ν : 3392 (OH) and 1688

(CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 253$ (M–H). HRMS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_5$ (M–H): 253.1081; found, 253.1081.

5.6.3 (1*R*,6*S*,10*S*)-4-butyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylic acid (**10d**)

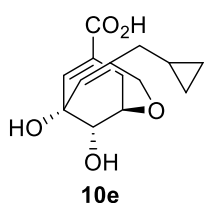


It was prepared following the general basic hydrolysis procedure using **41d** (87 mg), LiOH (1.2 mL) and THF (3 mL).

Yield = 98% (82 mg). White solid. Mp: 129.1–131.0 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -20.3^\circ$ (c1.0, H_2O). ^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ : 6.52 (br s, 1H,

H7), 5.47 (br s, 1H, H5), 4.39–4.32 (m, 2H, H1+OCHH-3), 4.25 (dd, $J = 1.8$ and 5.0 Hz, 1H, H10), 3.93 (br d, $J = 16.5$ Hz, 1H, OCHH-3), 2.57 (td, $J = 3.0$ and 18.6 Hz, 1H, CHH-9), 2.26 (br d, $J = 18.8$ Hz, 1H, CHH-9), 1.98 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 1.36–1.18 (m, 4H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$) and 0.83 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ : 172.7 (C), 143.1 (C), 136.6 (CH), 129.5 (C), 127.0 (CH), 73.3 (CH), 71.8 (C), 68.7 (CH), 65.3 (CH_2), 35.6 (CH_2), 29.3 (CH_2), 27.2 (CH_2), 21.7 (CH_2) and 13.2 (CH_3) ppm. FTIR (ATR) ν : 3367 (OH) and 1691 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 267$ (M–H). HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_5$ (M–H): 267.1238; found, 267.1235.

5.6.4 (1*R*,6*S*,10*S*)-4-cyclopropylmethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylic acid (**10e**)



It was prepared following the general basic hydrolysis procedure using **41e** (44 mg), LiOH (0.5 mL) and THF (1.4 mL).

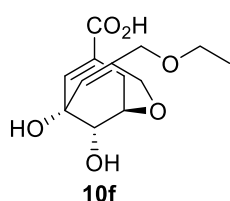
Yield = 99% (37 mg). White foam. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -14.8^\circ$ (c1.0, H_2O).

^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ : 6.43 (m, 1H, H7), 5.62 (m, 1H, H5),

4.42–4.36 (m, 2H, H1+OCHH-3), 4.26 (dd, $J = 1.6$ and 4.9 Hz, 1H, H10), 3.98 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H, OCHH-3), 2.57 (td, $J = 2.9$ and 18.7 Hz, 1H, CHH-9), 2.27 (d, $J = 18.5$ Hz, 1H, CHH-9), 1.87 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2), 0.73 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 0.48–0.42 (m, 2H, CHCH_2CH_2) and 0.04 (m, 2H, CH_2) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz,

D₂O) δ : 174.3 (C), 143.1 (C), 134.7 (CH), 131.3 (C), 126.9 (CH), 73.5 (CH), 72.0 (C), 68.7 (CH), 65.5 (CH₂), 40.1 (CH₂), 27.6 (CH₂), 8.5 (CH), 3.8 (CH₂) and 3.7 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3286 (OH) and 1680 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 265 (M–H). HRMS calcd for C₁₄H₁₇O₅ (M–H): 265.1081; found, 265.1079.

5.6.5 (1*R*,6*S*,10*S*)-4-ethoxymethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylic acid (10f)



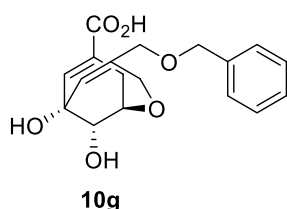
It was prepared following the general basic hydrolysis procedure using **41f** (39 mg), LiOH (0.6 mL) and THF (1.4 mL).

Reaction time = 30 min. Yield = 45% (17 mg). White

foam. $[\alpha]_D^{20} = -18.0^\circ$ (c1.0, H₂O). ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ :

6.71 (br s, 1H, H7), 5.82 (br s, 1H, H5), 4.45 (m, 1H, H1), 4.35 (m, 2H, H10+OCHH-3), 4.07 (d, J = 16.5 Hz, 1H, OCHH-3), 3.96 (s, 2H, CH₂OEt), 3.53 (q, J = 7.0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2.65 (dt, J = 2.6 and 18.8 Hz, 1H, CHH-9), 2.36 (br d, J = 18.5 Hz, 1H, CHH-9) and 1.18 (t, J = 7.0 Hz, 3H, OCH₂CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ : 171.0 (C), 139.0 (C), 137.7 (CH), 130.7 (CH), 128.4 (C), 73.4 (CH), 72.4 (CH₂), 71.5 (C), 68.2 (CH), 65.5 (CH₂), 63.3 (CH₂), 26.6 (CH₂) and 14.0 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3361 (OH) and 1689 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 269 (M–H). HRMS calcd for C₁₃H₁₇O₆ (M–H): 269.1031; found, 269.1030.

5.6.6 (1*R*,6*S*,10*S*)-4-benzyloxymethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(*Z*),7-diene-8-carboxylic acid (10g)



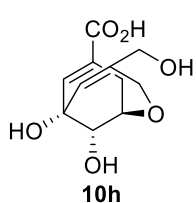
It was prepared following the general basic hydrolysis procedure using **41g** (58 mg), LiOH (0.7 mL) and THF (1.7 mL). Reaction time = 4 h. Yield = 99% (56 mg). White

solid. Mp: 186 °C (dec.). $[\alpha]_D^{20} = -5.5^\circ$ (c1.0, H₂O). ¹H NMR

(300 MHz, D₂O) δ : 7.38 (m, 5H, 5×ArH), 6.35 (br s, 1H, H7), 5.80 (br s, 1H, H5), 4.48 (br s, 2H, CH₂Ph), 4.37 (m, 1H, H1), 4.29 (d, J = 16.5 Hz, 1H, OCHH-3), 4.23 (d, J = 4.3 Hz, 1H, H10), 4.02 (d, J = 16.5 Hz, 1H, OCHH-3), 3.97 (br s, 2H,

CH_2OBn), 2.59 (dt, $J = 2.7$ and 18.7 Hz, 1H , CHH-9) and 2.28 (d, $J = 18.5$ Hz, 1H , CHH-9) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ : 175.0 (C), 137.8 (C), 137.1 (C), 133.1 (C), 132.7 (CH), 132.2 (CH), 128.6 ($2\times\text{CH}$), 128.5 ($2\times\text{CH}$), 128.2 (CH), 73.7 (CH), 72.5 (CH_2), 71.8 (C), 71.6 (CH_2), 68.4 (CH), 63.1 (CH_2) and 27.7 (CH_2) ppm. FTIR (ATR) ν : 3286 (OH) and 1681 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 331$ (M-H). HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_6$ (M-H): 331.1187; found, 331.1185.

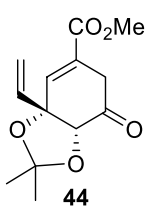
5.6.7 (1R,6S,10S)-4-hydroxymethyl-6,10-dihydroxy-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4(Z),7-diene-8-carboxylic acid (10h)



It was prepared following the general basic hydrolysis procedure using **41h** (58 mg), LiOH (0.9 mL) and THF (2.3 mL).

Reaction time = 8 h. Yield = 99% (55 mg). White solid. Mp: 117.3–119.2 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -28.1^\circ$ (c1.0, H_2O). ^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ : 6.36 (br s, 1H , H7), 5.59 (br s, 1H , H5), 4.26–4.19 (m, 2H , H1+OCHH-3), 4.14 (m, 1H , H10), 3.89–3.77 (m, 3H , OCHH-3+ CH_2OH), 2.45 (dt, $J = 2.8$ and 18.8 Hz, 1H , CHH-9) and 2.15 (br d, $J = 18.6$ Hz, 1H , CHH-9) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ : 175.4 (C), 143.8 (C), 138.2 (CH), 132.8 (C), 131.0 (CH), 76.1 (CH), 74.2 (C), 70.9 (CH), 66.4 (CH_2), 65.6 (CH_2) and 29.7 (CH_2) ppm. FTIR (ATR) ν : 3349 (OH) and 1688 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 241$ (M-H). HRMS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_6$ (M-H): 241.0718; found, 241.0719.

5.7 Methyl (3R,4S)-3,4-O-isopropylidendioxy-5-oxo-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (44)



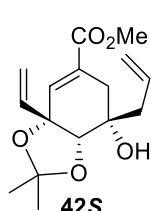
A solution of alcohol **23**⁶⁰ (72 mg, 0.28 mmol) in dry dichloromethane (2 mL), under argon and at room temperature, was treated with Dess-Martin periodinane (179 mg, 0.42 mmol) and the resulting solution was stirred at this temperature for 18 h. The reaction mixture was diluted

with diethyl ether and succesively washed with saturated $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and NaHCO_3 . The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with diethyl ether

($\times 2$). The combined organic extracts were dried (anh. Na_2SO_4), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by chromatography, eluting with (5:25:70) acetone/diethyl ether/hexane, to afford the ketone **44** (55 mg, 78%) as a yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = 145.2^\circ$ ($c 1.0$, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.74 (quint, $J = 1.3$ Hz, 1H, H2), 5.84 (dd, $J = 10.9$ and 17.4 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.29 (dd, $J = 0.4$ and 3.6 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHH}$), 5.24 (dd, $J = 0.5$ and 10.3 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHH}$), 4.05 (s, 1H, H4), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 3.49 (dd, $J = 2.8$ and 19.6 Hz, 1H, CHH-6), 2.43 (ddd, $J = 0.7$, 1.2 and 19.6 Hz, 1H, CHH-6), 1.44 (s, 3H, CH_3) and 1.43 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 203.0 (C), 165.7 (C), 137.3 (CH), 135.2 (CH), 126.8 (C), 118.3 (CH_2), 112.2 (C), 86.3 (C), 82.1 (CH), 52.4 (OCH_3), 36.0 (CH_2), 27.7 (CH_3) and 27.1 (CH_3) ppm. FTIR (ATR) ν : 1718 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 275$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{Na}$ (MNa^+): 275.0890; found, 275.0880.

5.8 Methyl (3*R*,4*S*,5*S*)-5-allyl-5-hydroxy-3,4-*O*-isopropylidendioxy-3-vinylcyclohex-1-eno-1-carboxylate (**42S**) and methyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-allyl-5-hydroxy-3,4-*O*-isopropylidendioxy-3-vinylcyclohex-1-eno-1-carboxylate (**42R**)

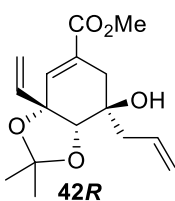
A solution of the ketone **44** (109 mg, 0.43 mmol) in dry THF (1 mL), under inert atmosphere and at room temperature, was added via canula over a round-bottom flask containing activated Zn (84 mg, 1.29 mmol). After shaking for 5 min, the reaction mixture was cooled at 0 °C and then treated with allyl bromide (45 μL , 0.52 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h and then filtered over a plug of Celite®. The filtrate and washings (diethyl ether) were washed with brine, dried (anh. Na_2SO_4), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with (5:15:80) methanol/dichloromethane/hexane, to yield 5% (6 mg) **42S** and 55% (70 mg) **42R**, both as a colorless oils.



Data for **42S**: $[\alpha]_D^{20} = 22.7^\circ$ (c 0.9, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ :

6.71 (br s, 1H, H2), 5.97–5.83 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2+\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.41 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHH}$), 5.33 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHH}$), 5.19 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHH}$), 5.07 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHH}$), 3.95

(s, 1H, H4), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 2.66 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H, $\text{CHH}-6$), 2.46 (dd, $J = 2.8$ and 17.2 Hz, 1H, $\text{CHH}-6$), 2.17 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 1.44 (s, 3H, CH_3) and 1.36 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 166.9 (C), 137.9 (CH), 136.0 (CH), 132.2 (CH), 129.2 (C), 119.9 (CH_2), 117.9 (CH_2), 109.4 (C), 82.6 (CH), 81.7 (C), 73.1 (C), 52.3 (OCH_3), 39.9 (CH_2), 32.7 (CH_2), 27.9 (CH_3) and 27.2 (CH_3) ppm. FTIR (ATR) ν : 3497 (OH) and 1717 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 317$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{Na}$ (MNa^+): 317.1359; found, 317.1363.



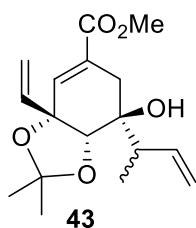
Data for **42R**: $[\alpha]_D^{20} = 85.9^\circ$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ :

6.71 (m, 1H, H2), 6.02–5.88 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2+\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.47 (dd, $J = 1.3$ and 17.4 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHH}$), 5.30–5.21 (m, 3H, $\text{CH}=\text{CHH}+\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 3.77 (m, 1H, H4),

2.48–2.44 (m, 4H, $\text{CH}_2-6+\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 1.42 (s, 3H, CH_3) and 1.34 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 167.5 (C), 138.4 (CH), 137.4 (CH), 131.9 (CH), 126.9 (C), 120.5 (CH_2), 115.5 (CH_2), 109.1 (C), 80.9 (C), 80.8 (CH), 72.3 (C), 52.1 (OCH_3), 44.4 (CH_2), 32.4 (CH_2), 28.0 (CH_3) and 26.9 (CH_3) ppm. FTIR (ATR) ν : 3488 (OH) and 1700 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 317$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{Na}$ (MNa^+): 317.1359; found, 317.1367.

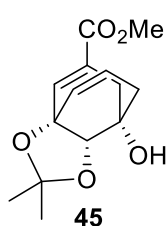
5.9 Methyl (3R,4S,5R)-5-[(R/S)-but-3-en-2-yl]-5-hydroxy-3,4-O-isopropylidendioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (**43**)

It was prepared following the procedure employed for compound **42** using ketone **44** (118 mg, 0.47 mmol), Zn (92 mg, 1.41 mmol), 1-bromo-2-butene (58 μL , 0.56 mmol), dry THF (1 mL). Eluent for chromatography = (15:85) diethyl acetate/hexane. Yield = 45% (64 mg) as a mixture of diastereoisomers in the allylic chain. Colorless



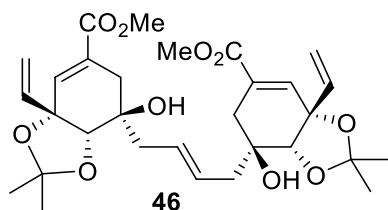
oils. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.68 (m, 2H, $\text{H}_2+\text{H}_2'$), 6.01–5.82 (m, 4H, $\text{CH}=\text{CH}_2+\text{CHCH}=\text{CH}_2+\text{CH}=\text{CH}_2'+\text{CHCH}=\text{CH}_2'$), 5.47 (dd, $J = 1.3$ and 6.2 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHH}$), 5.40 (dd, $J = 1.3$ and 6.2 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHH}'$), 5.23–5.13 (m, 6H, $\text{CH}=\text{CHH}+\text{CHCH}=\text{CH}_2+\text{CH}=\text{CHH}'+\text{CHCH}=\text{CH}_2'$), 3.91 (br s, 1H, H_4'), 3.85 (br s, 1H, H_4), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 3.75 (s, 3H, OCH_3'), 2.61–2.48 (m, 4H, $\text{CHH}-6+\text{CH}+\text{CHH}-6'+\text{CH}'$), 2.39 (dd, $J = 2.8$ and 10.5 Hz, 1H, $\text{CHH}-6$), 2.33 (dd, $J = 2.8$ and 10.5 Hz, 1H, $\text{CHH}-6'$), 1.41 (s, 3H, CH_3'), 1.37 (s, 3H, CH_3), 1.32 (s, 3H, CH_3'), 1.31 (s, 3H, CH_3), 1.11 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3') and 1.10 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 167.6 ($\text{C}+\text{C}'$), 138.9 (CH), 138.7 (CH'), 138.6 (CH), 138.4 (CH'), 137.1 (CH), 136.9 (CH'), 127.2 ($\text{C}+\text{C}'$), 117.5 (CH_2'), 117.3 (CH_2), 115.8 (CH_2), 115.7 (CH_2'), 109.1 (C'), 108.9 (C), 81.0 ($\text{C}+\text{C}'$), 79.7 (CH), 78.6 (CH'), 73.9 (C), 73.7 (C'), 52.1 ($\text{OCH}_3+\text{OCH}_3'$), 44.6 (CH), 44.6 (CH'), 32.7 (CH_2'), 31.0 (CH_2), 28.0 ($\text{CH}_3+\text{CH}_3'$), 26.9 (CH_3'), 26.8 (CH_3), 13.1 (CH_3'), and 12.9 (CH_3) ppm. FTIR (ATR) ν : 3505 (OH) and 1697 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 331$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{Na}$ (MNa^+): 331.1516; found, 331.1520.

5.10 Methyl (1*S*,5*S*,9*S*)-1-hydroxy-5,9-*O*-isopropylidendioxibicyclo[3.2.1]nona-3,6-diene-7-carboxylate (**45**)



It was prepared following the general RCM procedure using **42S** (13 mg, 0.044 mmol), 2nd generation Grubbs' catalyst (1.4 mg, 2.2 μmol), toluene (2 mL). Reaction time = 24 h. Eluent for chromatography = (25:75) ethyl acetate/hexane. Yield = 14% (1.6 mg). Yellow oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.63 (m, 1H, H_6), 6.05 (td, $J = 2.3$ and 9.5 Hz, 1H, H_3), 5.59 (td, $J = 3.7$ and 9.5 Hz, 1H, H_4), 4.09 (s, 1H, H_9), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 2.71 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H, $\text{CHH}-8$), 2.63–2.54 (m, 3H, $\text{CHH}-8+\text{CH}_2-2$), 2.10 (br s, 1H, OH), 1.47 (s, 3H, CH_3) and 1.39 (s, 3H, CH_3) ppm. FTIR (ATR) ν : 3462 (OH) and 1713 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 289$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{Na}$ (MNa^+): 289.1046; found, 289.1050.

5.11 Ring-closing metathesis of **42R** (**46**)



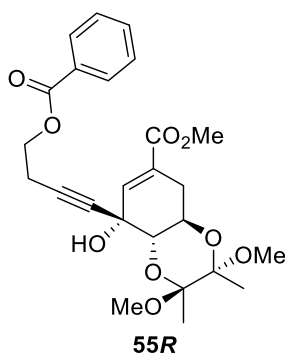
It was prepared following the general RCM procedure using **42R** (69 mg, 0.24 mmol), 2nd generation Grubbs' catalyst (7 mg, 12 μ mol), toluene (12 mL). Reaction time = 24 h. Eluent for chromatography = (15:85)

ethyl acetate/hexane. Yield = 29% (39 mg). It was also recovered 20 mg of starting material. Corrected yield = 57%. White solid. Mp: 136–137 °C. $[\alpha]_D^{20} = 79.6^\circ$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.68 (m, 2H, 2 \times H₂), 5.95 (dd, $J = 10.7$ and 17.4 Hz, 2H, 2 \times CH=CH₂), 5.73 (m, 2H, HC=CH), 5.44 (dd, $J = 1.4$ and 17.5 Hz, 2H, 2 \times CH=CHH), 5.20 (dd, $J = 1.4$ and 10.8 Hz, 2H, 2 \times CH=CHH), 3.76 (s, 6H, 2 \times OCH₃), 3.75 (s, 2H, 2 \times H₄), 2.51–2.41 (m, 8H, 2 \times CH₂(6)+2 \times CH₂), 1.39 (s, 6H, 2 \times CH₃) and 1.32 (s, 6H, 2 \times CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.5 (2 \times C), 138.4 (2 \times CH), 137.4 (2 \times CH), 129.2 (2 \times CH), 126.9 (2 \times C), 115.7 (2 \times CH₂), 109.2 (2 \times C), 80.9 (2 \times C+CH), 72.5 (2 \times C), 52.1 (2 \times OCH₃), 43.4 (2 \times CH₂), 32.5 (2 \times CH₂), 28.0 (2 \times CH₃) and 27.0 (2 \times CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3458 (OH) and 1696 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 583$ (MNa⁺). HRMS calcd for C₃₀H₄₀O₁₀Na (MNa⁺): 583.2514; found, 583.2513.

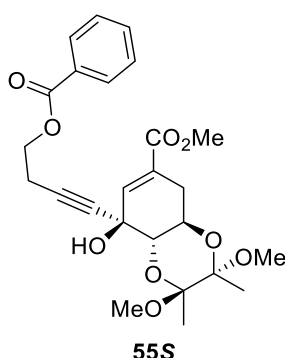
5.12 Methyl (1*R*,3*S*,4*S*,6*S*,7*S*)-7-(4-(benzoyloxy)but-1-yn-1-yl)-7-hydroxy-3,4-dimethoxy-3,4-dimethyl-2,5-dioxabicyclo[4.4.0]dec-8-ene-9-carboxylate (**55S**) and Methyl (1*R*,3*S*,4*S*,6*S*,7*R*)-7-(4-(benzoyloxy)but-1-yn-1-yl)-7-hydroxy-3,4-dimethoxy-3,4-dimethyl-2,5-dioxabicyclo[4.4.0]dec-8-ene-9-carboxylate (**55R**)

To a solution of the alkyne **54** (1.217 g, 6.99 mmol) in dry THF (18 mL), at –78 °C and under inert atmosphere, LiHMDS (7 mL, 7.33 mmol, *ca* 1 M in THF) was added dropwise over 10 min. After stirring for 1 h, a solution of the ketone **53** (1.000 g, 3.33 mmol) in dry THF (2 mL) was added dropwise over 5 min. The dry-ice bath was removed and the reaction mixture was allowed to warm up to room temperature for 20 min. Saturated ammonium chloride was added and the mixture was extracted with ethyl acetate ($\times 3$). The organic layers were combined, washed with

brine, dried (anh. Na₂SO₄), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography, eluting with (15:85) ethyl acetate/hexane, to afford the compounds **55S** (122 mg, 4%) and **55R** (942 mg, 28%), both as white foams.



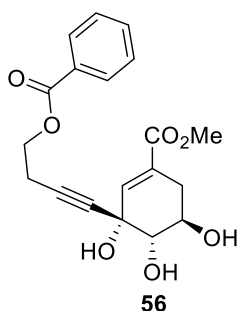
Data for **55R**: $[\alpha]_D^{20} = 90.8^\circ$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.05–8.02 (m, 2H, 2×ArH), 7.57 (m, 1H, ArH), 7.47–7.41 (m, 2H, 2×ArH), 6.80 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H8), 4.39 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, OCH₂), 4.00 (d, $J = 5.8$ and 10.6 Hz, 1H, H1), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.71 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, H6), 3.23 (s, 3H, OCH₃), 3.23 (s, 3H, OCH₃), 2.81 (dd, $J = 5.8$ and 17.6 Hz, 1H, CHH-10), 2.72 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, OCH₂CH₂), 2.26 (ddd, $J = 2.9$, 10.5 and 17.6 Hz, 1H, CHH-10), 1.31 (s, 3H, CH₃) and 1.29 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 166.5 (C), 166.3 (C), 136.7 (CH), 133.2 (CH), 129.9 (C), 129.7 (C), 129.7 (2×CH), 128.5 (2×CH), 100.3 (C), 99.2 (C), 82.5 (C), 80.7 (C), 74.3 (CH), 66.2 (C), 63.0 (CH), 62.6 (CH₂), 52.3 (OCH₃), 48.0 (OCH₃), 47.8 (OCH₃), 29.7 (CH₂), 19.4 (CH₂), 17.7 (CH₃) and 17.6 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3432 (OH) and 1717 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 497$ (MNa⁺). HRMS calcd for C₂₅H₃₀O₉Na: 497.1782; found, 497.1779.



Data for **55S**: $[\alpha]_D^{20} = -33.7^\circ$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.03 (m, 2H, 2×ArH), 7.59–7.54 (m, 1H, ArH), 7.46–7.41 (m, 2H, 2×ArH), 6.69 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H8), 4.43 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH₂), 4.03 (dt, $J = 6.4$ and 10.4 Hz, 1H, H1), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.68 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H6), 3.28 (s, 3H, OCH₃), 3.22 (s, 3H, OCH₃), 2.75–2.69 (m, 3H, OCH₂CH₂+CHH-10), 2.34 (ddd, $J = 2.8$, 10.3 and 17.7 Hz, 1H, CHH-10), 1.32 (s, 3H, CH₃) and 1.29 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 166.5 (C), 166.4 (C), 138.9 (CH), 133.2 (CH), 129.9 (C), 129.7 (2×CH), 128.5 (2×CH), 127.4 (C), 99.6 (C), 99.0 (C), 84.8 (C), 79.8 (C), 74.9 (CH), 69.2 (C), 64.9 (CH), 62.7 (CH₂), 52.2 (OCH₃), 48.0 (OCH₃), 48.0

(OCH₃), 29.9 (CH₂), 19.7 (CH₂), 17.8 (CH₃) and 17.7 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3452 (OH) and 1717 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 497 (MNa⁺). HRMS calcd for C₂₅H₃₀O₉Na: 497.1782; found, 497.1785.

5.13 Methyl (3*S*,4*R*,5*S*)-3-(4-(benzoyloxy)but-1-yn-1-yl)-3,4,5-trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (**56**)

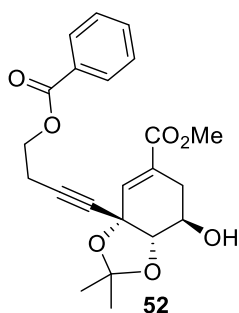


It was prepared following the general acetal deprotection procedure using acetal **55R** (301 mg, 0.63 mmol), (20:1) TFA/H₂O (1.4 mL). Eluent for chromatography = (75:25) ethyl acetate/hexane. Yield = 57% (130 mg). Colorless oil. $[\alpha]_D^{20}$ = -9.3° (c1.0, CH₃OH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 8.05 (m, 2H, 2×ArH), 7.63 (m, 1H, ArH), 7.53–7.47 (m, 2H, 2×ArH), 6.72 (br s, 1H, H₂),

4.45 (t, J = 6.6 Hz, 2H, OCH₂), 3.87–3.74 (m, 1H, H₅), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.53 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H₄), 2.87–2.75 (m, 3H, CHH-6+OCH₂CH₂) and 2.13 (ddd, J = 2.8, 9.5 and 17.8 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CD₃OD) δ : 168.3 (C), 167.8 (C), 139.4 (CH), 134.3 (CH), 131.3 (C), 130.6 (2×CH), 129.7 (C), 129.6 (2×CH), 84.3 (C), 81.8 (C), 78.8 (CH), 68.4 (C), 67.6 (CH), 63.8 (CH₂), 52.6 (OCH₃), 33.7 (CH₂) and 20.1 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3400 (OH) and 1717 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 383 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₉H₂₀O₇Na (MNa⁺): 383.1101; found, 383.1107.

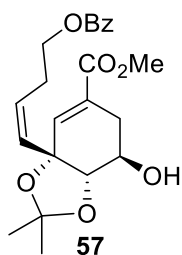
5.14 Methyl (3*S*,4*R*,5*R*)-3-(4-(benzoyloxy)but-1-yn-1-yl)-5-hydroxy-3,4-*O*-isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (**52**)

A solution of the triol **56** (135 mg, 0.37 mmol), 2,2-dimethoxypropane (0.23 mL, 1.87 mmol) and camphorsulphonic acid (9 mg, 37 μ mol) in acetone (9 mL) was heated under reflux for 8 h. After cooling to room temperature, powdered K₂CO₃ was added until pH 7 and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was partitioned between diethyl ether and water. The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (×2). The combined organic extracts were washed with saturated sodium bicarbonate, dried



(anh. Na_2SO_4), filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography over silica gel, eluting with (40:60) ethyl acetate/hexane, to yield acetal **52** (129 mg, 87%), as a colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = 53.6^\circ$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.05–8.00 (m, 2H, $2\times\text{ArH}$), 7.59–7.52 (m, 1H, ArH), 7.45–7.39 (m, 2H, $2\times\text{ArH}$), 6.75 (m, 1H, H2), 4.51–4.34 (m, 2H, OCH_2), 4.27 (d, $J = 5.1$, 1H, H4), 4.20 (m, 1H, H5), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 2.70 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH_2), 2.59 (m, 1H, CHH-6), 2.48 (dd, $J = 4.5$ and 17.8 Hz, 1H, CHH-6), 1.44 (s, 3H, CH_3) and 1.32 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 167.1 (C), 166.5 (C), 135.3 (CH), 133.3 (CH), 129.9 (C), 129.8 ($2\times\text{CH}$), 128.5 ($2\times\text{CH}$), 126.6 (C), 110.8 (C), 83.9 (C), 81.2 (CH), 80.6 (C), 72.6 (C), 67.2 (CH), 62.3 (CH_2), 52.2 (OCH_3), 28.2 (CH_3), 27.7 (CH_2), 26.6 (CH_3) and 19.9 (CH_2) ppm. FTIR (ATR) ν : 3485 (OH) and 1710 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 423$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{Na}$: 423.1414; found, 423.1415.

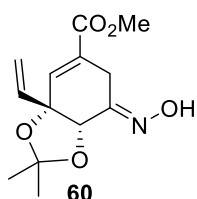
5.15 Methyl (3*S*,4*R*,5*R*)-3-(4-(benzyloxy)but-1-en-1-yl)-5-hydroxy-3,4-*O*-isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (**57**)



A stirred solution of $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (1 mg, 1 μmol), dppb (2 mg, 4 μmol) and the alkyne **52** (40 mg, 0.10 mmol) in dry dioxane (0.1 mL), under argon and at room temperature, was treated with formic acid (8 μL , 0.21 mmol). The resulting reaction mixture was heated to 80 $^\circ\text{C}$ for 15 h. After cooling to room temperature the solvent was concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography, eluting with (15:85) ethyl acetate/hexane, to yield the alkene **57** (5 mg, 12%) as a colorless oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.08–8.06 (m, 2H, $2\times\text{ArH}$), 7.58 (m, 1H, ArH), 7.48–7.43 (m, 2H, $2\times\text{ArH}$), 6.81 (m, 1H, H2), 5.71–5.59 (m, 2H, $\text{HC}=\text{CH}$), 4.31 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, OCH_2), 4.14 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H4), 3.78 (m, 1H, H5), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 2.89 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 2.67 (m, 1H, CHH-6), 2.50 (dd,

$J = 3.7$ and 17.6 Hz, 1H, CHH-6), 1.45 (s, 3H, CH₃) and 1.37 (s, 3H, CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3475 (OH) and 1720 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 425$ (MNa⁺). HRMS calcd for C₂₂H₂₄O₇Na: 425.1571; found, 425.1568.

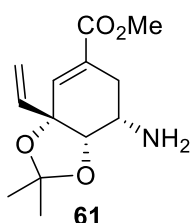
5.16 Methyl (3*R*,4*S*)-5-hydroxyimino-3,4-*O*-isopropylidendioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (**60**)



To a solution of ketone **44** (70 mg, 0.28 mmol) in dry methanol (0.5 mL) was added hydroxylamine hydrochloride (39 mg, 0.56 mmol) followed by dry pyridine (0.5 mL). After stirring at room temperature for 2 h, water was added and the solution was

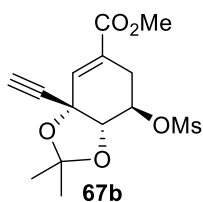
extracted with dichloromethane (×3). The combined organic extracts were dried (anh. Na₂SO₄), filtered, and concentrated under reduce pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography on silica gel, eluting with (25:75) ethyl acetate/hexane, to give the oxime **60** (75 mg, 99%) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = 94.2^\circ$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.67 (m, 1H, H₂), 5.81 (dd, $J = 10.9$ and 17.3 Hz, 1H, =CH), 5.23 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H, =CHH), 5.21 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H, =CHH), 4.33 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H₄), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (dd, $J = 22.0$ and 1.9 Hz, 1H, CHH-6), 3.02 (dd, $J = 2.4$ and 22.0 Hz, 1H, CHH-6), 1.41 (s, 3H, CH₃) and 1.37 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 166.6 (C), 151.8 (C), 137.9 (CH), 135.7 (CH), 126.1 (C), 118.3 (CH₂), 110.6 (C), 82.6 (C), 78.1 (CH), 52.4 (OCH₃), 27.9 (CH₃), 27.1 (CH₃) and 21.5 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3386 (OH) and 1717 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 268$ (MH⁺). HRMS calcd for C₁₃H₁₈NO₅ (MH⁺): 268.1179; found, 268.1179.

5.17 Methyl (3S,4S,5S)-5-amino-3,4-O-isopropylidendioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (**61**)



To a mixture of the oxime **60** (97 mg, 0.36 mmol) and MoO₃ (73.4 mg, 0.51 mmol) in dry methanol (3.6 mL), at room temperature and under argon, NaBH₄ (136 mg, 3.60 mmol) was added portionwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h and then was treated with brine. The resulting precipitate was filtered off. The filtrate and the washings were extracted with ethyl acetate (×3). The combined organic layers were dried (anh. Na₂SO₄), filtered, and concentrated under reduce pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography on silica gel, eluting with (50:50) ethyl acetate/hexane, to give amine **61** (38 mg, 42%) and the **59** amine (9 mg, 10%), both as colorless oils. Data for **61**: $[\alpha]_D^{20} = 102.6^\circ$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.55 (br s, 1H, H2), 5.89 (dd, $J = 10.8$ and 17.4 Hz, 1H, =CH), 5.26 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, =CHH), 5.21 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, =CHH), 3.96 (s, 1H, H4), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 2.99 (m, 1H, H5), 2.62 (dd, $J = 5.5$ and 17.0 Hz, 1H, CHH-6), 2.21 (ddd, $J = 2.9$, 10.9 and 17.0 Hz, 1H, CHH-6), 1.72 (br s, 2H, NH₂), 1.41 (s, 3H, CH₃) and 1.31 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 167.0 (C), 138.2 (CH), 136.7 (CH), 129.5 (C), 117.6 (CH₂), 109.6 (C), 82.0 (C), 81.3 (CH), 52.1 (OCH₃), 47.3 (CH), 29.1 (CH₂), 27.8 (CH₃) and 27.1 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3365 (NH₂) and 1712 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 254$ (MH⁺). HRMS calcd for C₁₃H₂₀NO₄ (MH⁺): 254.1387; found, 254.1388.

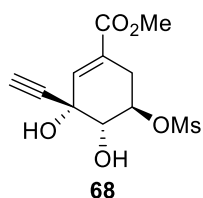
5.18 Methyl (3S,4S,5R)-3-ethynyl-3,4-O-isopropylidendioxy-5-(methylsulfonyloxy)cyclohex-1-ene-1-carboxylate (**67b**)



A solution of the alcohol **67**⁶⁰ (152 mg, 0.60 mmol) in dry dichloromethane (2 mL) and dry triethylamine (125 μ L, 0.90 mmol) was cooled at 0 °C and then treated dropwise over 30 min with mesyl chloride (56 μ L, 0.72 mmol). The reaction mixture was stirred

0 °C for 30 min and then treated with aqueous K₂CO₃ (20%) until pH \cong 8–9. The aqueous layer was separated and the organic layer was extracted with dichloromethane ($\times 2$). The combined organic extracts were dried (anh. Na₂SO₄), filtered and concentrated under reduced pressure to give the compound **67b** (198 mg, 99%) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = 50.8^\circ$ (*c*1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.81 (br s, 1H, H₂), 5.11 (q, *J* = 4.9 Hz, 1H, H₅), 4.52 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H₄), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.07 (s, 3H, CH₃), 2.74 (dt, *J* = 4.9 and 2.0 Hz, 2H, CH₂-6), 2.69 (s, 1H, \equiv CH), 1.53 (s, 3H, CH₃) and 1.37 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 166.3 (C), 135.1 (CH), 126.2 (C), 112.0 (C), 81.7 (C), 78.6 (CH), 75.8 (CH), 75.2 (CH), 72.6 (C), 52.5 (OCH₃), 38.8 (CH₃), 28.0 (CH₃), 26.6 (CH₃) and 26.3 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3274 and 2113 (–C \equiv CH), 1717 (CO) and 1169 (SO₂) cm^{–1}. MS (ESI) *m/z* = 353 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₄H₁₈O₇SNa (MNa⁺): 353.0665; found, 353.0668.

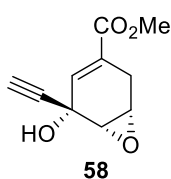
5.19 Methyl (3*S*,4*S*,5*R*)-3-ethynyl-3,4-dihydroxy-5-(methylsulfonyloxy)cyclohex-1-ene-1-carboxylate (**68**)



It was prepared following the general acetal deprotection procedure using acetal **67b** (198 mg, 0.60 mmol), HCl (0.10 mL, 0.60 mmol, 6 M), methanol (4 mL). Eluent chromatography = (85:15) diethyl ether/hexane. Yield = 36% (62 mg) (from compound **67**).

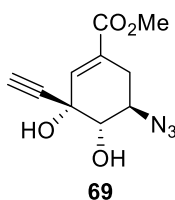
White solid. Mp: 144–145 °C. $[\alpha]_D^{20} = -47.0$ (*c*1.0, CH₃OH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 6.77 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₂), 4.73 (dt, *J* = 6.2 and 9.8 Hz, 1H, H₅), 3.83 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H₄), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.14 (s, 3H, CH₃), 3.05 (m, 1H, CHH-6), 3.01 (s, 1H, \equiv CH) and 2.49 (ddd, *J* = 2.8, 9.4 and 17.9 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CD₃OD) δ : 167.5 (C), 138.9 (CH), 129.2 (C), 85.4 (C), 79.1 (CH), 75.3 (CH), 74.5 (CH), 68.4 (C), 52.8 (OCH₃), 38.4 (CH₃) and 32.7 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3472 (OH), 3281 and 2113 (–C \equiv CH) and 1717 (CO) cm^{–1}. MS (ESI) *m/z* = 313 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₁H₁₄O₇SNa (MNa⁺): 313.0352; found, 313.0352.

5.20 Epoxide **58**



A solution of mesylate **68** (51 mg, 0.18 mmol) in dry methanol (0.2 mL), under inert atmosphere and at room temperature, was treated with a solution of sodium methoxide (68 mg, 1.26 mmol) in dry methanol (0.5 mL). After stirring for 7 h, the solvent was concentrated under reduced pressure and the crude residue was diluted with dichloromethane and water. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (×2). The combined organic extracts were dried (anh. Na₂SO₄), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography, eluting with (85:15) diethyl ether/hexane, to afford the epoxide **58** (15 mg, 43%) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = 6.2^\circ$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 6.62 (m, 1H, H2), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.59–3.54 (m, 2H, H5+H4), 3.19 (s, 1H, CH), 3.02 (d, $J = 19.8$ Hz, 1H, CHH-6) and 2.54 (td, $J = 2.5$ and 19.8 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CD₃OD) δ : 168.1 (C), 137.8 (CH), 126.7 (C), 82.7 (C), 76.7 (CH), 66.0 (C), 58.9 (CH), 52.6 (OCH₃), 52.1 (CH) and 25.1 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3425 (OH) and 1707 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 217$ (MNa⁺). HMRS calcd for C₁₀H₁₀O₄Na (MNa⁺): 217.0471; found, 217.0470.

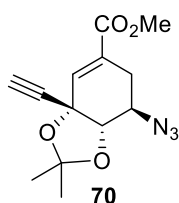
5.21 Methyl (3*S*,4*S*,5*R*)-5-azido-3-ethynyl-3,4-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (**69**)



A solution of the epoxide **58** (48 mg, 0.25 mmol) in acetic acid (0.23 mL) was treated with an aqueous solution of sodium azide (77 μ L, 17 M). The resulting mixture was heated at 40 °C for 24 h. After cooling to room temperature, diethyl ether and water were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with diethyl ether (×2). The combined organic extracts were washed with saturated NaHCO₃, dried (anh. Na₂SO₄), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography over silica gel, eluting with (5:50:45)

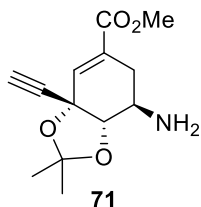
acetone/diethyl ether/hexane, to give the azide **69** (27 mg, 45%) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = 46.6^\circ$ (*c*1.0, CH₃OH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 6.76 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H₂), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.73 (m, 1H, H₅), 3.81 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H, H₄), 2.97 (s, 1H, CH), 2.82 (dd, *J* = 5.2 and 18.0 Hz, 1H, CHH-6) and 2.09 (ddd, *J* = 2.8, 9.8 and 18.0 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CD₃OD) δ : 167.8 (C), 138.9 (CH), 130.0 (C), 85.7 (C), 78.0 (CH), 74.2 (CH), 67.9 (C), 59.4 (CH), 52.7 (OCH₃) and 31.4 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3420 (OH), 2099 (N₃) and 1712 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) *m/z* = 260 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₀H₁₁N₃O₄Na (MNa⁺): 260.0642; found, 260.0643.

5.22 Methyl (3*S*,4*S*,5*R*)-5-azido-3-ethynyl-3,4-*O*-isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (**70**)



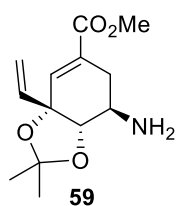
A solution of the triol **69** (50 mg, 0.21 mmol) and camphorsulfonic acid (1 mg, 4.20 μ mol), under inert atmosphere, in 2,2-dimethoxypropane (0.5 mL, 4.35 mmol) was stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was diluted with diethyl ether and NaHCO₃. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with diethyl ether ($\times 3$). The combined organic extracts were dried (anh. Na₂SO₄), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography eluting with (10:90) ethyl acetate/hexane, to afford the acetal **70** (40 mg, 69%) as a yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = 96.4^\circ$ (*c*1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.80 (br s, 1H, H₂), 4.40 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H₄), 4.04 (c, *J* = 5.0 Hz, 1H, H₅), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 2.72 (s, 1H, \equiv CH), 2.65 (ddd, *J* = 2.2, 4.5 and 17.8 Hz, 1H, CHH-6), 2.49 (dd, *J* = 5.0 and 17.9 Hz, 1H, CHH-6), 1.54 (s, 3H, CH₃) and 1.38 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 166.4 (C), 135.0 (CH), 127.1 (C), 111.6 (C), 81.7 (C), 79.7 (CH), 75.6 (CH), 72.3 (C), 57.4 (CH), 52.4 (OCH₃), 28.1 (CH₃), 26.6 (CH₃) and 24.9 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 2104 (N₃) and 1718 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) *m/z* = 300 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₃H₁₅N₃O₄Na (MNa⁺): 300.0955; found, 300.0954.

5.23 Methyl (3*S*,4*S*,5*R*)-5-amino-3-ethynyl-3,4-*O*-isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (**71**)



A solution of the azide **70** (60 mg, 0.22 mmol) in THF (5.4 mL) and water (50 μ L) was treated with triphenylphosphine (64 mg, 0.24 mmol) and then heated under reflux for 4 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the resulting residue was purified by flash chromatography over silica gel, eluting with (2:98) methanol/dichloromethane, to give the amine **71** (46 mg, 83%) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = 47.8^\circ$ (c 1.0, CH₃OH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 6.70 (m, 1H, H₂), 4.27 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, H₄), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.26–3.20 (m, 2H, H₅+HC \equiv), 2.58 (ddd, $J = 1.9, 4.7$ and 17.6 Hz, 1H, CHH-6), 2.28 (ddd, $J = 1.0, 5.7$ and 17.5 Hz, 1H, CHH-6), 1.52 (s, 3H, CH₃) and 1.34 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CD₃OD) δ : 168.3 (C), 135.8 (CH), 129.6 (C), 112.1 (2 \times C), 84.3 (CH), 77.3 (CH), 73.4 (C), 52.7 (OCH₃), 49.6 (CH), 28.9 (CH₂), 28.6 (CH₃) and 27.0 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3373 (NH₂) and 1710 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 252$ (MH⁺). HRMS calcd for C₁₃H₁₈NO₄ (MH⁺): 252.1230; found, 252.1229.

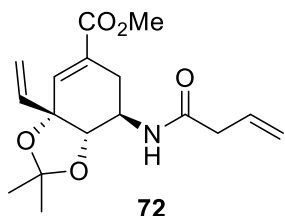
5.24 Methyl (3*S*,4*S*,5*R*)-5-amino-3,4-*O*-isopropylidendioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (**59**)



A suspension of the alkyne **71** (40 mg, 0.16 mmol) and Lindar catalyst (6 mg) in ethanol (1.6 mL) was shaken under hydrogen atmosphere at room temperature for 72 h. The hydrogen atmosphere was removed under vacuum and the mixture was filtered over a plug of Celite®. The filtrate and washings (ethanol) were evaporated under reduced pressure to yield a colorless oil that was purified by flash chromatography, eluting with (5:95) methanol/dichloromethane, to give the amine **59** (31 mg, 77%) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = 77.4^\circ$ (c 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.71 (m, 1H, H₂), 5.94 (dd, $J = 10.7$ and 17.5 Hz, 1H, =CH), 5.39 (dd, $J = 1.0$ and 17.5 Hz, 1H,

=CHH), 5.22 (dd, $J = 1.0$ and 10.7 Hz, 1H, =CHH), 3.97 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H, H4), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.51 (sa, 1H, H5), 2.61 (ddd, $J = 2.6$, 4.8 and 17.7 Hz, 1H, CHH-6), 2.32 (dd, $J = 2.8$ and 17.6 Hz, 1H, CHH-6), 1.40 (s, 3H, CH₃) and 1.32 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 167.4 (C), 139.3 (CH), 136.7 (CH), 127.8 (C), 116.3 (CH₂), 109.3 (C), 80.9 (CH), 79.3 (C), 52.1 (OCH₃), 48.2 (CH), 28.6 (CH₂), 28.2 (CH₃) and 27.3 (CH₃) ppm. FTIR (film): 3373 (NH) and 1717 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 254$ (MH⁺). HRMS calcd for C₁₃H₂₀NO₄ (MH⁺): 254.1387; found, 254.1385.

5.25 Methyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-(3-butenamido)-3,4-*O*-isopropylidenedioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (**72**)

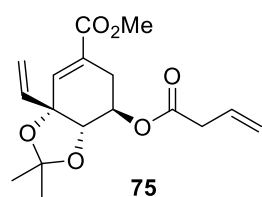


To a stirred solution of 3-butenic acid (17 μ L, 0.20 mmol), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride (50 mg, 0.26 mmol) and 4-(dimethylamino)pyridine (2 mg, 20 μ mol) in dry dichloromethane (0.8 mL), under argon and at 0 °C, the

amine **59** (50 mg, 0.20 mmol) in dry dichloromethane (0.2 mL) was added. After stirring for 30 min at 0 °C, the ice bath was removed and the reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The reaction mixture was diluted with water and ethyl acetate, the organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate ($\times 2$). The combined organic extracts were dried (anh. Na₂SO₄), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with (3:97) methanol/dichloromethane, to afford the amide **72** (49 mg, 77%) as a yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = 50.7^\circ$ (c 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.74 (m, 1H, H2), 5.92–5.70 (m, 2H, 2 \times CH=CH₂), 5.64 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 5.32–5.24 (m, 2H, CH=CH₂), 5.18–5.07 (m, 2H, CH=CH₂), 4.63 (m, 1H, H5), 4.08 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H4), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 2.88 (br d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 2.66 (ddd, $J = 2.9$, 5.3 and 18.2 Hz, 1H, CHH-6), 2.41 (br d, $J = 18.2$ Hz, 1H, CHH-6), 1.37 (s, 3H, CH₃) and 1.28 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 170.0 (C), 166.9 (C), 139.0 (CH), 136.8 (CH), 130.9

(CH), 128.0 (C), 120.3 (CH₂), 117.4 (CH₂), 109.7 (C), 76.8 (C), 76.3 (CH), 52.3 (OCH₃), 45.5 (CH), 41.6 (CH₂), 27.8 (CH₃), 27.0 (CH₃) and 25.2 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3280 (NH), 1712 (CO) and 1645 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 344 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₇H₂₃NO₅Na (MNa⁺): 344.1468; found, 344.1465.

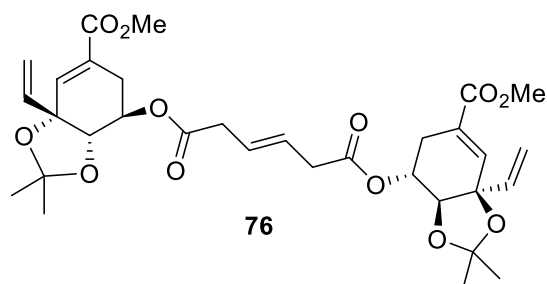
5.26 Methyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-(3-butenoyloxy)-3,4-*O*-isopropylidenedioxy-3-vinylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (**75**)



To a stirred solution of 3-butenic acid (130 μ L, 1.56 mmol) in dry dichloromethane (0.9 mL), under argon and at 0 °C, oxalyl chloride (130 μ L, 1.56 mmol) was added dropwise. After 1 h stirring at 0 °C, the ice bath was removed and the reaction mixture was stirred for 1.5 h at room temperature. The alcohol **23**⁶⁰ (265 mg, 1.04 mmol) in dry dichloromethane (7 mL) and triethylamine (430 μ L, 3.12 mmol) were added and the resultant solution was stirred for 4 h. The reaction mixture was successively washed with saturated NaHCO₃ (\times 3) and NaCl (\times 3), the organic layer was dried (anh. Na₂SO₄), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with (25:75) diethyl ether/hexane, to afford the ester **75** (82 mg, 24%) as a colorless oil. It was also recovered 80 mg of starting material. Corrected yield = 54%. $[\alpha]_D^{20}$ = 98.3° (c 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.68 (quint, J = 1.4 Hz, 1H, H₂), 5.89–5.75 (m, 2H, CH=CH₂+CH=CH₂), 5.44 (dt, J = 2.7 and 3.9 Hz, 1H, H₅), 5.39 (dd, J = 1.3 and 17.4 Hz, 1H, HC=CHH), 5.21 (dd, J = 1.3 and 10.7 Hz, 1H, HC=CHH), 5.14 (m, 1H, HC=CHH), 5.10 (qd, J = 1.4 and 9.8 Hz, 1H, HC=CHH), 4.04 (dd, J = 1.2 and 4.0 Hz, 1H, H₄), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.01 (q, J = 1.5 Hz, 1H, CHH), 2.98 (q, J = 1.6 Hz, 1H, CHH), 2.67–2.51 (m, 2H, CH₂-6), 1.39 (s, 3H, CH₃) and 1.32 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 170.4 (C), 167.1 (C), 137.6 (CH), 137.2 (CH), 129.8 (CH), 126.5 (C), 119.0 (CH₂), 116.3 (CH₂), 109.8 (C), 79.8 (C), 75.9 (CH), 68.5 (CH), 52.2 (OCH₃), 39.1 (CH₂), 27.9 (CH₃), 27.0 (CH₃) and 25.0 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 1737 (CO) and 1717 (CO) cm⁻¹.

MS (ESI) m/z = 345 (MNa^+). HRMS calcd for $C_{17}H_{22}O_6Na$ (MNa^+): 345.1309; found, 345.1306.

5.27 Ring-closing metathesis of **23**



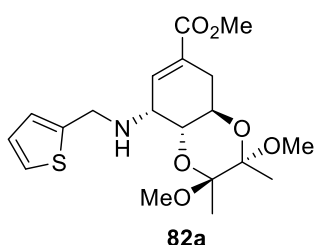
It was prepared following the general RCM procedure using **75** (82 mg, 0.25 mmol), 2nd generation Grubbs' catalyst (3 mg, 5.08 μ mol), toluene (13 mL). Reaction time = 24 h. Eluent for chromatography = (40:60)

diethyl ether/hexane. Yield = 27% (41 mg). Yellow oil. $[\alpha]_D^{20}$ = 100.8° (c 1.0, $CHCl_3$). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.68 (s, 2H, 2 \times H₂), 5.82 (dd, J = 10.7 and 18.0 Hz, 2H, 2 \times CH=CH₂), 5.69–5.43 (m, 2H, HC=CH), 5.38 (dd, J = 1.2 and 17.4 Hz, 2H, 2 \times CH=CHH), 5.21 (dd, J = 1.1 and 10.7 Hz, 2H, 2 \times CH=CHH), 4.04 (d, J = 3.8 Hz, 2H, 2 \times H₄), 3.77 (s, 6H, 2 \times OCH₃), 2.98 (t, J = 2.1 Hz, 2H, 2 \times H₅), 2.68–2.51 (m, 4H, 2 \times CH₂–6), 1.40 (s, 6H, 2 \times CH₃) and 1.32 (s, 6H, 2 \times CH₃) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 170.4 (2 \times C), 167.0 (2 \times C), 137.7 (2 \times CH), 137.1 (2 \times CH), 126.5 (2 \times C), 125.9 (2 \times CH), 116.4 (2 \times CH₂), 109.8 (2 \times C), 79.7 (2 \times C), 75.8 (2 \times CH), 68.6 (2 \times CH), 52.2 (2 \times OCH₃), 37.7 (2 \times CH₂), 27.9 (2 \times CH₃), 27.0 (2 \times CH₃) and 25.0 (2 \times CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 1713 (CO) cm^{-1} .

5.28 General procedure for reductive amination

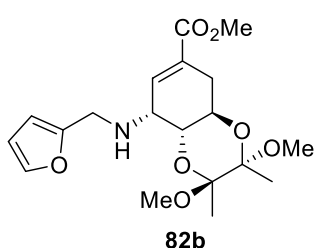
A suspension of amine **79**⁹⁵ or **80**⁶⁰ (1 mmol), 4 Å molecular sieves and sodium acetate (2 mmol) in dry methanol (5 mL), at room temperature and under inert atmosphere, was treated with the correspondent aldehyde **81** (1 mmol) and sodium cyanoborohydride (2 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h and then filtered over a plug of Celite®. The filtrate and the washings were concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography on silica gel.

5.28.1 Methyl (1*R*,3*S*,4*S*,6*R*,7*R*)-3,4-dimethyl-3,4-dimethoxy-2,5-dioxa-7-[*N*-(thien-2-yl)methyl]aminobicycle[4.4.0]dec-8-en-9-carboxylate (82a)



It was prepared following the general reductive amination procedure using the amine **79**⁹⁵ (410 mg, 1.36 mmol), 4 Å molecular sieves (410 mg), sodium acetate (224 mg, 2.72 mmol), 2-thiophenecarboxaldehyde (130 µL, 1.36 mmol), sodium cyanoborohydride (171 mg, 2.72 mmol), methanol (6.8 mL). Eluent for chromatography = (50:50) ethyl acetate/hexane. Yield = 31% (165 mg). Yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = -32.6^\circ$ (c1.6, CHCl₃). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 7.17 (m, 1H, ArH), 6.91 (m, 2H, H8+ArH), 6.84 (m, 1H, ArH), 4.20–4.07 (m, 1H, H1), 4.08 (m, 2H, CH₂N), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.62 (m, 1H, H6), 3.48 (m, 1H, H7), 3.21 (s, 3H, OCH₃), 3.18 (s, 3H, OCH₃), 2.76 (dd, *J* = 6.0 and 17.5 Hz, 1H, CHH-10), 2.30 (s, 1H, NH), 2.19 (dd, *J* = 10.3 and 17.5, 1H, CHH-10), 1.27 (s, 3H, CH₃) and 1.25 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 166.6 (C), 144.0 (C), 136.7 (CH), 129.5 (C), 126.4 (CH), 124.8 (CH), 124.3 (CH), 99.4 (C), 98.8 (C), 70.2 (CH), 62.9 (CH), 52.7 (CH), 51.7 (OCH₃), 47.7 (2×OCH₃), 46.5 (CH₂), 30.0 (CH₂), 17.6 (CH₃) and 17.6 (CH₃) ppm. FTIR (film) ν: 3326 (NH) and 1719 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) *m/z* = 398 (MH⁺). HRMS calcd for C₁₉H₂₈NSO₆ (MH⁺): 398.1632; found, 398.1636.

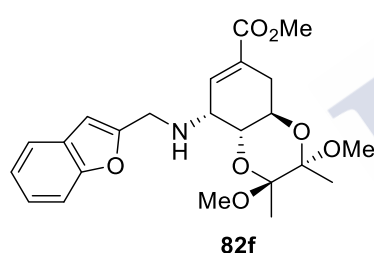
5.28.2 Methyl (1*R*,3*S*,4*S*,6*R*,7*R*)-3,4-dimethyl-3,4-dimethoxy-2,5-dioxa-7-[*N*-(furan-2-yl)methyl]aminobicycle[4.4.0]dec-8-en-9-carboxylate (82b)



It was prepared following the general reductive amination procedure using the amine **79**⁹⁵ (378 mg, 1.26 mmol), 4 Å molecular sieves (378 mg), sodium acetate (207 mg, 2.52 mmol), 2-furancarboxaldehyde (100 µL, 1.26 mmol), sodium cyanoborohydride (158 mg, 2.52 mmol), methanol (6.3 mL). Eluent for chromatography = (50:50) ethyl acetate/hexane. Yield = 40% (193 mg). Yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = -1.7^\circ$ (c1.1, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.30

(m, 1H, ArH), 6.80 (m, 1H, H7), 6.25 (m, 1H, ArH), 6.16 (dd, $J = 3.2$ Hz and 9.0 Hz, 1H, ArH), 4.13 (m, 1H, H1), 3.85 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H, CHHN), 3.74 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H, CHHN), 3.66 (s, 3H, OCH₃), 3.61 (dd, $J = 10.8$ and 5.3 Hz, 1H, H6), 3.38 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H, H7), 3.18 (s, 3H, OCH₃), 3.16 (s, 3H, OCH₃), 2.73 (dd, $J = 6.2$ and 17.6 Hz, 1H, CHH-10), 2.63 (br s, 1H, NH), 2.16 (m, 1H, CHH-10), 1.25 (s, 3H, CH₃) and 1.23 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ : 166.7 (C), 153.7 (C), 141.9 (CH), 136.6 (CH), 129.8 (C), 110.0 (CH), 107.2 (CH), 99.6 (C), 99.0 (C), 70.0 (CH), 62.9 (CH), 57.0 (CH), 52.9 (OCH₃), 51.9 (OCH₃), 47.8 (OCH₃), 44.4 (CH₂), 30.1 (CH₂), 17.8 (CH₃) and 17.7 (CH₃) ppm. FTIR (film) ν : 3331 (NH) and 1720 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 382$ (MH⁺). HRMS calcd for C₁₉H₂₈NO₇ (MH⁺): 382.1860; found, 382.1874.

5.28.3 Methyl (1R,3S,4S,6R,7R)-7-[N-(benzofuran-2-yl)methyl]amino-3,4-dimethyl-3,4-dimethoxy-2,5-dioxabicyclo[4.4.0]dec-8-en-9-carboxylate (82f)

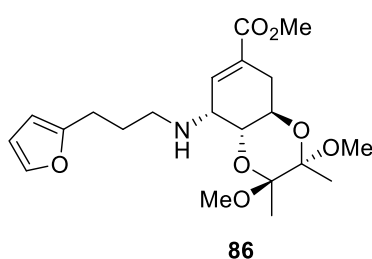


It was prepared following the general reductive amination procedure using amine **79**⁹⁵ (193 mg, 0.64 mmol), 4 Å molecular sieves (193 mg), sodium acetate (105 mg, 1.28 mmol), benzofuran-2-carboxaldehyde (0.08 mL, 0.64 mmol), sodium cyanoborohydride (80.4

mg, 1.28 mmol), methanol (3.2 mL). Eluent for chromatography = (50:50) ethyl acetate/hexane. Yield = 24% (102 mg). Yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = -48.1^\circ$ (c1.1, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.54–7.50 (m, 1H, ArH), 7.47–7.43 (m, 1H, ArH), 7.27–7.17 (m, 2H, 2xArH), 6.93 (m, 1H, H2), 6.61 (m, 1H, ArH), 4.22 (dt, $J = 10.4$ and 6.2 Hz, 1H, H1), 4.09 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H, CHHN), 3.97 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H, CHHN), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.71–3.67 (m, 1H, H6), 3.53 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H, H7), 3.27 (s, 3H, OMe), 3.21 (s, 3H, OMe), 2.82 (dd, $J = 6.1$ and 17.6 Hz, 1H, CHH-10), 2.30 (br s, 1H, NH), 2.27–2.20 (m, 1H, CHH-10), 1.32 (s, 3H, CH₃) and 1.30 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 166.9 (C), 156.9 (C), 155.1 (C), 136.6 (CH), 130.2 (C), 128.5 (C), 123.9 (CH), 122.7 (CH), 120.8 (CH), 111.2 (CH), 104.1 (CH), 99.8 (C), 99.1 (C), 70.3 (CH), 63.1 (CH), 53.2 (OCH₃), 52.1 (CH), 48.1 (2xOCH₃), 45.0 (CH₂), 30.3 (CH₂), 18.0 (CH₃) and

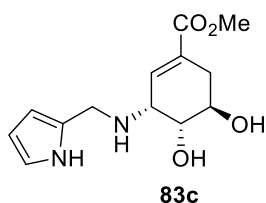
17.9 (CH₃) ppm. FTIR (film) ν : 2955 (NH) and 1718 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 432 (MH⁺). HRMS calcd for C₂₃H₃₀NO₇ (MH⁺): 432.2019; found, 432.2017.

5.28.4 Methyl (1*R*,3*S*,4*S*,6*R*,7*R*)-3,4-dimethyl-3,4-dimethoxy-2,5-dioxo-7-[*N*-3-(furan-2-yl)propyl]aminobicyclo[4.4.0]dec-8-en-9-carboxylate (86)



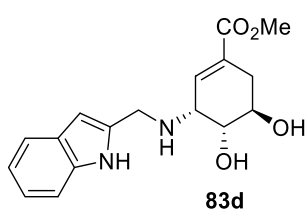
It was prepared following the general reductive amination procedure using the amine **79**⁹⁵ (145 mg, 0.48 mmol), 4 Å molecular sieves (145 mg), sodium acetate (78.7 mg, 0.96 mmol), 3-(furan-2-yl)propanal¹⁰⁰ (60.3 mg, 0.48 mmol) and sodium cyanoborohydride (60.3 mg, 0.48 mmol), methanol (2.4 mL). Eluent for chromatography = (75:25) diethyl ether/hexane. Yield = 15% (62 mg). Yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = -2.5^\circ$ (c 1.1, CHCl₃). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ : 7.29 (m, 1H, ArH), 6.85 (dd, J = 5.1 and 2.2 Hz, 1H, H2), 6.26 (dd, J = 1.9 and 3.1 Hz, 1H, ArH), 5.99 (dd, J = 0.6 and 3.1 Hz, 1H, ArH), 4.21–4.10 (dt, J = 10.6 and 6.1 Hz, 1H, H1), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.69 (dd, J = 10.6 and 5.1 Hz, 1H, H6), 3.41 (t, J = 5.1 Hz, 1H, H7), 3.21 (s, 6H, 2×OCH₃), 2.85–2.62 (m, 6H, CHH-10+NH+2×CH₂), 2.28–2.17 (m, 1H, CHH-10), 1.91–1.78 (m, 2H, CH₂), 1.27 (s, 3H, CH₃) and 1.26 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 167.0 (C), 155.9 (C), 140.9 (CH), 137.5 (CH), 129.6 (C), 110.2 (CH), 105.0 (CH), 99.8 (C), 99.1 (C), 70.2 (CH), 63.1 (CH), 54.9 (CH), 52.1 (OCH₃), 48.2 (CH₂), 48.1 (OCH₃), 48.0 (OCH₃), 30.3 (CH₂), 28.7 (CH₂), 25.8 (CH₂), 18.0 (CH₃) and 17.8 (CH₃) ppm. FTIR (film) ν : 2948 (NH) and 1718 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 410 (MH⁺). HRMS calcd for C₂₁H₃₂NO₇ (MH⁺): 410.2170; found, 410.2173.

5.28.5 Methyl (3*R*,4*R*,5*R*)-4,5-dihydroxy-3-[(pirrol-2-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (83c)



It was prepared following the general reductive amination procedure using the amine **80**⁶⁰ (290 mg, 1.55 mmol), 4 Å molecular sieves (290 mg), sodium acetate (254 mg, 3.10 mmol), 2-pirrolcarboxaldehyde (147 mg, 1.55 mmol), sodium cyanoborohydride (194 mg, 3.10 mmol), methanol (7.8 mL). Eluent for chromatography = (10:90) methanol/dichloromethane. Yield = 24% (97 mg). Brown solid. Mp: 125–128 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -40^{\circ}$ (c1.0, MeOH). ¹H NMR (250 MHz, CD₃OD) δ : 6.81 (br s, 1H, ArH), 6.69 (m, 1H, H2), 6.02 (m, 2H, ArH), 4.00 (m, 1H, H5), 3.88 (s, 2H, CH₂), 3.83 (m, 1H, H4), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.52 (m, 1H, H3), 2.65 (m, 1H, CHH-6) and 2.25 (m, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CD₃OD) δ : 168.7 (C), 138.4 (CH), 129.8 (C), 129.6 (C), 118.6 (CH), 108.5 (CH), 108.1 (CH), 69.1 (CH), 68.6 (CH), 54.2 (CH), 52.3 (OCH₃), 44.3 (CH₂) and 30.4 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3343 and 3286 (NH+OH) and 1713 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 289 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₃H₁₈N₂O₄Na (MNa⁺): 289.1159; found, 289.1164.

5.28.6 Methyl (3*R*,4*R*,5*R*)-4,5-dihydroxy-3-[*N*-(1*H*-indol-2-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (83d)

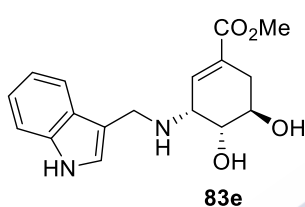


It was prepared following the general reductive amination procedure using the amine **80**⁶⁰ (310 mg, 1.66 mmol), 4 Å molecular sieves (310 mg), sodium acetate (272 mg, 3.32 mmol), 2-indolcarboxaldehyde (241 mg, 1.66 mmol), sodium cyanoborohydride (208 mg, 3.32 mmol), methanol (8.3 mL). Eluent for chromatography = (10:90) methanol/dichloromethane. Yield = 74% (388 mg). Yellow solid. Mp: 94–95 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -161.4^{\circ}$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ : 9.25 (s, 1H, NH), 7.47 (d, J = 6.4 Hz, 1H, ArH), 7.27–7.23 (m, 2H, 2×ArH), 7.02 (m, 2H, 2×ArH), 6.73 (br s, 1H, H2), 6.30 (s, 1H, NH), 4.00 (m, 3H, CH₂+H5), 3.83 (d, J =

11.4 Hz, 1H, H4), 3.64 (s, 3H, OCH₃), 3.45 (br s, 1H, OH), 3.32 (s, 1H, H3), 2.69 (br d, $J = 15.1$ Hz, 1H, CHH-6) and 2.04 (br d, $J = 15.1$ Hz, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C RMN (63 MHz, CDCl₃) δ : 166.7 (C), 136.4 (C), 134.5 (C), 134.5 (CH), 129.7 (C), 127.8 (C), 121.9 (CH), 120.2 (CH), 119.7 (CH), 111.0 (CH), 102.1 (CH), 70.3 (CH), 67.5 (CH), 54.1 (CH), 52.1 (OCH₃), 44.6 (CH₂) and 31.1 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3350 (NH+OH) and 1697 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 317$ (MH⁺). HRMS calcd for C₁₇H₂₁N₂O₄ (MH⁺): 317.1496; found, 317.1506.

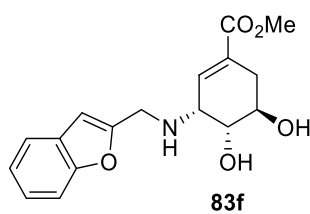
5.28.7 Methyl

(3*R*,4*R*,5*R*)-4,5-dihydroxy-3-[*N*-(1*H*-indol-3-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (83e)



It was prepared following the general reductive amination procedure using the amine **80**⁶⁰ (170 mg, 0.91 mmol), 4 Å molecular sieves (170 mg), sodium acetate (149 mg, 1.82 mmol), 3-indolcarboxaldehyde (132 mg, 0.91 mmol), sodium cyanoborohydride (114 mg, 1.82 mmol), methanol (4.6 mL). Eluent for chromatography = (10:90) methanol/dichloromethane. Yield = 22% (62 mg). Yellow solid. Mp: 101–102 °C. $[\alpha]_D^{20} = -144.9^\circ$ (c0.8, CHCl₃). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.42 (br s, 1H, NH), 7.63 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, ArH), 7.33 (br d, $J = 8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.22–7.12 (m, 3H, 3×ArH), 7.09 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, H2), 6.98 (br s, 1H, NH), 4.17 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H, CHHN), 4.00 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H, CHHN), 3.78 (m, 1H, H4), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.57–3.51 (m, 2H, H5+H3), 2.83–2.76 (m, 3H, CHH-6+2×OH) and 2.14 (dd, $J = 8.5$ and 17.5 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.0 (C), 136.4 (CH), 136.4 (C), 129.2 (C), 126.7 (C), 123.1 (CH), 122.3 (CH), 119.8 (CH), 118.6 (CH), 113.6 (C), 111.5 (CH), 70.8 (CH), 68.2 (CH), 54.4 (CH), 52.1 (OCH₃), 43.5 (CH₂) and 30.8 (CH₂) ppm. FTIR (film) ν : 3309 (NH+OH) and 1697 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z : 339 (MNa⁺). EMAR calcd for C₁₇H₂₀N₂O₄Na (MNa⁺): 339.1315; found, 339.1307.

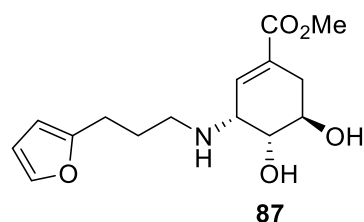
5.28.8 Methyl (3*R*,4*R*,5*R*)-3-[*N*-(benzofuran-2-yl)methyl]amino-4,5-dihydroxycyclohex-1-eno-1-carboxylate (83f)



It was prepared following the general reductive amination procedure using the amine **80**⁶⁰ (157 mg, 0.84 mmol), 4 Å molecular sieves (157 mg), sodium acetate (138 mg, 1.68 mmol), benzofuran-2-carboxaldehyde (0.1 mL, 0.84 mmol)

sodium cyanoborohydride (106 mg, 1.68 mmol), methanol (4.2 mL). Eluent for chromatography = (75:25) ethyl acetate/hexane. Yield = 71% (188 mg). Yellow foam. $[\alpha]_D^{20} = -208.6^\circ$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.50 (m, 1H, ArH), 7.43 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, ArH), 7.25–7.16 (m, 2H, 2×ArH), 6.74 (m, 1H, H₂), 6.60 (s, 1H, ArH), 4.02 (s, 2H, CH₂), 3.69 (m, 1H, H₅), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 3.54 (m, 1H, H₃), 3.45 (m, 1H, H₄), 3.17 (br s, 1H, NH), 2.85 (dd, $J = 17.6$ and 5.1 Hz, 1H, CHH-6) and 2.15 (dd, $J = 17.6$ and 8.8 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 167.1 (C), 155.6 (C), 154.9 (C), 136.3 (CH), 129.1 (C), 128.2 (C), 124.3 (CH), 123.0 (CH), 121.1 (CH), 111.2 (CH), 104.9 (CH), 71.2 (CH), 68.0 (CH), 55.0 (CH), 52.2 (OCH₃), 45.4 (CH₂) and 32.1 (CH₂) ppm. FTIR (film) ν : 3379 (NH+OH) and 1703 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 318 (MH⁺). HRMS calcd for C₁₇H₂₀NO₅ (MH⁺): 318.1340; found, 318.1336.

5.28.9 Methyl (3*R*,4*R*,5*R*)-4,5-dihydroxy-3-[(furan-2-yl)propyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (87)



amine **80**⁶⁰ (156 mg, 0.84 mmol), 4 Å molecular sieves (156 mg), sodium acetate (137 mg, 1.67 mmol), 3-(furan-2-yl)propanal¹⁰⁰ (104 mg, 0.84 mmol), sodium cyanoborohydride (105 mg, 1.67 mmol), methanol (4.2

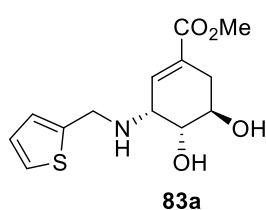
mL). Eluent for chromatography = (10:90) methanol/dichloromethane. Yield = 18% (45 mg). Yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = -182.5^\circ$ (c1.1, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.28 (dd, $J = 0.8$ and 1.8 Hz, 1H, ArH), 6.94 (m, 1H, H₂), 6.26 (dd, $J = 1.8$ and 3.2 Hz, 1H,

ArH), 5.99 (dd, $J = 0.8$ and 3.2 Hz, 1H, ArH), 3.74 (s, 3H, OMe), 3.63 (m, 1H, H5), 3.54 (dd, $J = 9.0$ and 5.4 Hz, 1H, H4), 3.38 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H, H3), 2.99–2.91 (m, 2H, CH₂), 2.81 (dd, $J = 17.8$ and 5.1 Hz, 1H, CHH-6), 2.97 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, CHH), 2.93 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, CHH), 2.21–2.11 (td, $J = 17.8$, 8.0 and 2.0 Hz, 1H, CHH-6) and 1.85 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 166.8 (C), 154.9 (C), 140.9 (CH), 135.6 (CH), 129.4 (C), 110.0 (CH), 105.1 (CH), 70.5 (CH), 68.0 (CH), 55.3 (CH), 51.9 (OMe), 47.7 (CH₂), 30.6 (CH₂), 28.4 (CH₂) and 25.3 (CH₂) ppm. FTIR (film) ν : 3368 (NH+OH) and 1703 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 296$ (MH⁺). HRMS calcd for C₁₅H₂₂NO₅ (MH⁺): 296.1490; found, 296.1492.

5.29 General procedure for bisacetal deprotection

A solution of acetals **82** (1 mmol) in a (20:1) (v/v) mixture of trifluoroacetic acid/water (2 mL) was stirred at room temperature for 15 min. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue was purified by flash chromatography to give diols **83**.

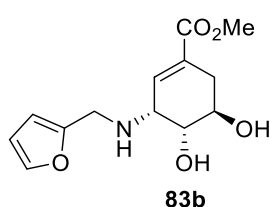
5.29.1 Methyl (3*R*,4*R*,5*R*)-4,5-dihydroxy-3-[*N*-(tien-2-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (**83a**)



It was prepared following the bisacetal deprotection procedure using the acetal **82a** (124 mg, 0.31 mmol), a (20:1) (v/v) mixture of trifluoroacetic acid/water (0.6 mL). Eluent for chromatography = (75:25) ethyl acetate/hexane. Yield = 58% (50 mg). Brown solid. Mp: 101–102 °C. $[\alpha]_D^{20} = -18.8^\circ$ (c1.1, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.26–7.24 (m, 1H, ArH), 6.96 (s, 1H, ArH), 6.95 (m, 1H, ArH), 6.93–6.91 (m, 1H, H2), 4.21 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, CHH), 4.06 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, CHH), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.67–3.59 (m, 1H, H5), 3.53–3.48 (m, 2H, H4+H3), 2.86 (dd, $J = 5.1$ and 17.9 Hz, 1H, CHH-6), 2.58 (br s, 3H, NH+2×OH) and 2.23–2.12 (m, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 167.0 (C), 142.8 (C), 136.3 (CH), 129.4 (C), 126.8 (CH), 125.7 (CH), 125.2 (CH), 70.9 (CH), 67.9 (CH), 54.3 (OCH₃), 52.1 (CH), 46.9 (CH₂) and

30.9 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3476 (NH), 3280 (OH) and 1688 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 284 (MH⁺). HRMS calcd for C₁₃H₁₈NO₄S (MH⁺): 284.0951; found, 284.0953.

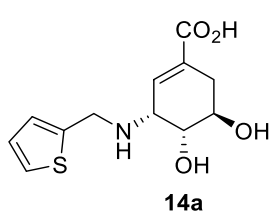
5.29.2 Methyl (3*R*,4*R*,5*R*)-4,5-dihydroxy-3-[*N*-(furan-2-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (**83b**)



It was prepared following the bisacetal deprotection procedure using the acetal **82b** (166 mg, 0.44 mmol), (20:1) (v/v) mixture of trifluoroacetic acid/water (0.9 mL). Eluent for chromatography = (50:50) ethyl acetate/hexane. Yield = 89%

(103 mg). Brown oil. $[\alpha]_D^{20} = -28.9^\circ$ (c2.6, MeOH). ¹H NMR (250 MHz, CD₃OD) δ : 7.57 (br s, 1H, ArH), 6.66 (br s, 1H, ArH), 6.61 (d, J = 3.1 Hz, 1H, H2), 6.44 (m, 1H, ArH), 4.87 (s, 2H, CH₂), 4.38 (m, 1H, H4), 4.06 (m, 1H, H5), 4.00 (m, 1H, H3), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 2.59 (dd, J = 2.7 and 18.9 Hz, 1H, CHH-6) and 2.34 (d, J = 18.9 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CD₃OD) δ : 167.8 (C), 146.2 (C), 145.9 (CH), 133.7 (C), 129.7 (CH), 114.0 (CH), 112.2 (CH), 68.1 (CH), 65.7 (CH), 55.1 (CH), 52.6 (OCH₃), 41.7 (CH₂) and 29.2 (CH₂) ppm. FTIR (film) ν : 3358 (NH+OH) and 1668 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 268 (MH⁺). HRMS calcd for C₁₃H₁₈NO₅ (MH⁺): 268.1179; found, 268.1174.

5.30 (3*R*,4*R*,5*R*)-4,5-dihydroxy-3-[*N*-(thien-2-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylic acid (**14a**)

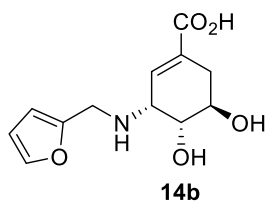


It was prepared following the general basic hydrolysis procedure described for compounds **41** using the ester **83a** (30 mg, 0.11 mmol), LiOH (0.5 mL, 0.5 M), tetrahydrofuran (1.1 mL). Amberlite GC-50 (H+). Yield = 61% (19 mg). White solid.

Mp: 178–180 °C. $[\alpha]_D^{20} = -42.5^\circ$ (c0.8, H₂O). ¹H NMR (250 MHz, D₂O) δ : 7.54 (d, J = 5.1 Hz, 1H, ArH), 7.30 (d, J = 3.4 Hz, 1H, ArH), 7.10 (m, 1H, ArH), 6.37 (s, 1H, H2), 4.79 (s, 2H, CH₂), 4.60 (s, 1H, H4), 4.10 (s, 2H, H3+H5), 2.69 (d, J = 18.6 Hz, 1H, CHH-6) and 2.31 (d, J = 18.6 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, D₂O) δ : 174.6 (C), 139.6 (C), 131.8 (C+CH), 129.5 (CH), 128.5 (CH), 123.1 (CH), 67.4 (CH), 65.9 (CH),

54.4 (CH), 43.2 (CH₂) and 30.3 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3362 (NH+OH) and 1561 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 268 (M-H). HRMS calcd for C₁₂H₁₄NO₄S (M-H): 268.0649; found, 268.0643.

5.31 (3*R*,4*R*,5*R*)-4,5-dihydroxy-3-[*N*-(furan-2-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylic acid (**14b**)



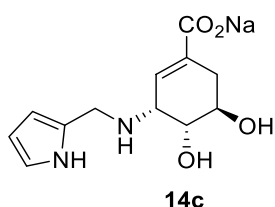
It was prepared following the general basic hydrolysis procedure described for compounds **41** using the ester **83b** (30 mg, 0.11 mmol), LiOH (0.6 mL, 0.5 M), tetrahydrofuran (1.1 mL). Amberlite GC-50 (H+). Yield = 78% (22 mg). Brown solid.

Mp: 204–205 °C. $[\alpha]_D^{20}$ = -15.2° (c1.1, H₂O). ¹H NMR (250 MHz, D₂O) δ : 7.58 (s, 1H, ArH), 6.67 (d, J = 3.1 Hz, 1H, H2), 6.48 (br s, 1H, ArH), 6.35 (br s, 1H, ArH), 4.79 (m, 2H, CH₂), 4.42 (s, 1H, H4), 4.10 (s, 1H, H5), 4.04 (m, 1H, H3), 2.68 (d, J = 18.3 Hz, 1H, CHH-6) and 2.31 (d, J = 18.4 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, D₂O) δ : 145.6 (CH), 144.8 (C), 123.3 (CH), 119.2 (C), 114.6 (C), 113.7 (CH), 111.7 (CH), 67.3 (CH), 66.0 (CH), 54.7 (CH), 41.5 (CH₂) and 30.3 (CH₂) ppm. FTIR (film) ν : 3406 (NH+OH) and 1676 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 252 (M-H). HRMS calcd for C₁₂H₁₄NO₅ (M-H): 252.0877; found, 252.0871.

5.32 General procedure for the synthesis of carboxylic acids as sodium salts

A solution of methyl esters **83** and **87** (1 mmol) in THF (10 mL) was treated with an aqueous solution of NaOH (1 M) and stirred at room temperature for 7 h. Milli-Q water was added, the organic solvent was removed under reduced pressure and the aqueous solution was washed with diethyl ether (×3) and freeze-dried to afford the sodium salts **14c–f** and **15**.

5.32.1 Sodium (3*R*,4*R*,5*R*)-4,5-dihydroxy-3-[*N*-(pirrol-2-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (**14c**)



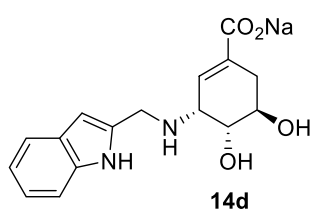
It was prepared following the general procedure for the synthesis of carboxylic acids as sodium salts using ester ester

83c (34 mg, 0.13 mmol), NaOH (0.25 mL, 0.5 M), THF (1.2 mL).

Yield = 93% (33 mg). White solid. Mp: 189–190 °C. $[\alpha]_D^{20} = -$

60.8° (c1.1, H₂O). ¹H NMR (250 MHz, D₂O) δ: 6.79 (s, 1H, ArH), 6.43 (br s, 1H, H₂), 6.11 (s, 2H, 2×ArH), 4.04–3.98 (m, 1H, H₅), 3.87–3.81 (m, 3H, CH₂+H₄), 3.40 (s, 1H, H₃), 2.60 (m, 1H, CHH-6) and 2.17 (m, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, D₂O) δ: 176.2 (C), 134.4 (CH), 132.1 (C), 130.4 (C), 118.9 (CH), 108.1 (CH), 107.3 (CH), 69.0 (CH), 68.0 (CH), 53.0 (CH), 42.9 (CH₂) and 31.1 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν: 3317 (NH+OH) and 1555 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) *m/z* = 275 (MH⁺). HRMS calcd for C₁₂H₁₆N₂O₄Na (MH⁺): 275.1002; found, 275.1003.

5.32.2 Sodium (3*R*,4*R*,5*R*)-4,5-dihydroxy-3-[*N*-(1*H*-indol-2-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (**14d**)



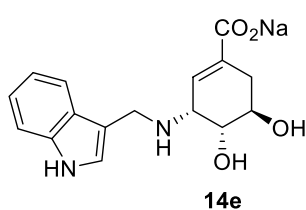
It was prepared following the general procedure for the synthesis of carboxylic acids as sodium salts using the ester

83d (40 mg, 0.13 mmol), NaOH (0.25 mL, 0.5 M), THF (1.2 mL). Yield = 85% (35 mg). White solid. Mp: 224–225 °C.

$[\alpha]_D^{20} = -50.5^\circ$ (c1.1, H₂O). ¹H NMR (250 MHz, D₂O) δ: 7.34 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 6.93 (m, 1H, ArH), 6.84 (m, 1H, ArH), 6.23 (br s, 1H, H₂), 6.19 (s, 1H, ArH), 3.78 (m, 1H, H₅), 3.73 (s, 2H, CH₂), 3.54 (m, 1H, H₄), 3.17 (br s, 1H, H₃), 2.39 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H, CHH-6) and 1.94 (dd, *J* = 4.2 and 18.0 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 176.1 (C), 138.2 (C), 136.7 (C), 134.5 (C), 132.0 (CH), 128.5 (C), 122.2 (CH), 120.7 (CH), 120.2 (CH), 112.0 (CH), 100.8 (CH), 69.3 (CH), 68.0 (CH), 53.3 (CH), 45.4 (CH₂) and 31.2 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν: 3342 (NH+OH)

and 1548 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 325$ (MH^+). HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$ (MH^+): 325.1159; found, 325.1160.

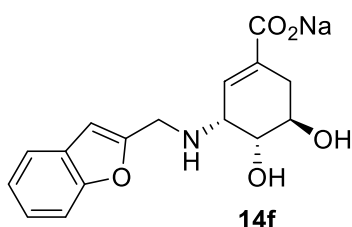
5.32.3 Sodium (3*R*,4*R*,5*R*)-4,5-dihydroxy-3-[*N*-(1*H*-indol-3-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (14e)



It was prepared following the general procedure for the synthesis of carboxylic acids as sodium salts using the ester **83e** (15.7 mg, 0.05 mmol), NaOH (0.1 mL, 0.5 M), THF (0.5 mL). Yield = 90% (14.6 mg). White solid. Mp: 198–199 °C.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -54.7^\circ$ (c1.1, H_2O). ^1H NMR (250 MHz, D_2O) δ : 7.68 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, ArH), 7.46 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.30 (s, 1H, ArH), 7.23–7.08 (m, 2H, 2×ArH), 6.49 (s, 1H, H2), 4.05–4.00 (m, 3H, $\text{CH}_2 + \text{H}_4$), 3.85 (m, 1H, H5), 3.47 (br s, 1H, H3), 2.60 (br d, $J = 18.2$ Hz, 1H, CHH-6) and 2.17 (dd, $J = 3.9$ and 18.2 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, D_2O) δ : 176.2 (C), 136.7 (C), 134.4 (C), 132.3 (CH), 127.0 (C), 125.2 (CH), 122.5 (CH), 120.0 (CH), 119.0 (CH), 112.8 (CH), 112.4 (CH), 68.9 (CH), 68.1 (CH), 53.2 (CH), 41.2 (CH_2) and 31.1 (CH_2) ppm. FTIR (ATR) ν : 3317 (NH+OH) and 1555 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 325$ (MH^+). HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$ (MH^+): 325.1159; found, 325.1158.

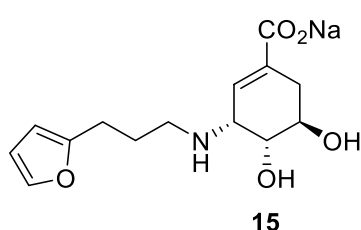
5.32.4 Sodium (3*R*,4*R*,5*R*)-3-[(benzofuran-2-yl)methyl]amino-4,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (14f)



It was prepared following the general procedure for the synthesis of carboxylic acids as sodium salts using the methyl ester **83f** (136.7 mg, 0.43 mmol), NaOH (0.84 mL, 0.42 mmol, 0.5 M), tetrahydrofuran (3.9 mL). Reaction time 30 min. Yield = 99% (139 mg). Yellow oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -54.7^\circ$ (c1.1, H_2O). ^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ : 7.59 (m, 1H, ArH), 7.51 (m, 1H, ArH), 7.33 (dd, $J = 7.3$ and 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.29–7.23 (m, 1H, ArH), 6.72 (m, 1H, ArH), 6.48 (m, 1H, H2), 4.10–4.04 (m, 1H, H5), 3.97 (s, 2H, CH_2), 3.88–3.84 (dd, $J = 6.8$ and 4.5 Hz, 1H, H4), 3.46 (m, 1H,

H3), 2.72–2.63 (m, 1H, CHH-6) and 2.27–2.19 (m, 1H, CHH-6) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 176.1 (C), 156.3 (C), 155.2 (C), 134.7 (CH), 131.8 (C), 128.8 (C), 124.8 (CH), 123.5 (CH), 121.7 (CH), 111.7 (CH), 105.2 (CH), 69.0 (CH), 68.0 (CH), 53.4 (CH), 43.5 (CH_2) and 31.2 (CH_2) ppm. FTIR (film) ν : 3332 (NH+OH) and 1552 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) m/z = 302 (M-Na). HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{NO}_5$ (M-Na): 302.1025; found, 302.1034.

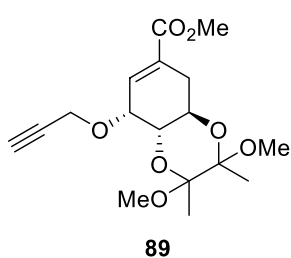
5.32.5 Sodium (3*R*,4*R*,5*R*)-4,5-dihydroxy-3-[3-(furan-2-yl)propyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (15)



It was prepared following the general procedure for the synthesis of carboxylic acids as sodium salts using the ester **87** (91 mg, 0.31 mmol), NaOH (0.6 mL, 0.3 mmol, 0.5 M), THF (2.8 mL). Yield = 98% (93 mg). White solid.

Mp: 197.6–198.9 °C. $[\alpha]_D^{20} = -25.4^\circ$ (c 0.7, H_2O). ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 7.32 (m, 1H, ArH), 6.54 (m, 1H, H2), 6.26 (m, 1H, ArH), 6.03 (d, J = 3.2 Hz, 1H, ArH), 3.88 (m, 1H, H5), 3.69 (dd, J = 5.0 and 7.7 Hz, 1H, H4), 3.38 (m, 1H, H3), 2.87–2.65 (m, 5H, $2\times\text{CH}_2+\text{CHH-6}$), 2.22 (dd, J = 5.7 and 18.1 Hz, 1H, CHH-6) and 1.86 (m, 2H, CH_2) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, D_2O) δ : 176.2 (C), 156.6 (C), 142.0 (CH), 134.2 (C), 132.4 (CH), 111.0 (CH), 105.7 (CH), 68.6 (CH), 68.1 (CH), 54.1 (CH), 43.2 (CH_2), 30.9 (CH_2), 27.9 (CH_2) and 25.6 (CH_2) ppm. FTIR (film) ν : 3351 (NH+OH) and 1557 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) m/z = 280 (M-Na). HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_5$ (M-Na): 280.1186; found, 280.1190.

5.33 Methyl (1*R*,3*R*,4*S*,6*R*,7*S*)-3,4-dimethyl-3,4-dimethoxy-2,5-dioxo-7-(2-propynyl)bicyclo[4.4.0]dec-8-en-9-carboxylate (89)



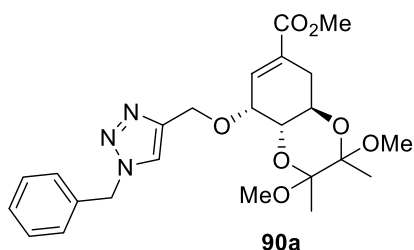
A solution of the alcohol **88**¹⁰¹ (438 mg, 1.45 mmol) in dry THF (18.1 mL), under argon and at 0 °C, was treated with NaH (64 mg, 1.60 mmol, *ca* 60% w/w in mineral oil) and stirred for 30 min. Propargyl bromide (0.14 mL, 1.57 mmol) was then added and the suspension was stirred at room

temperature for 3 h. Saturated NH_4Cl was added and the organic solvent was removed under reduced pressure. The resulting aqueous solution was extracted with ethyl acetate ($\times 3$). The combined organic extracts were dried (anh. Na_2SO_4), filtered and concentrated under reduced pressure. The reaction crude was purified by flash chromatography, eluting with (60:40) diethyl ether/hexane, to afford the alkyne **89** (283 mg, 57%) as a white solid. Mp: 76.9–77.8 °C. $[\alpha]_D^{20} = -6.2^\circ$ (c 1.3, CHCl_3). ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 6.80 (dd, $J = 2.5$ and 5.4 Hz, 1H, H8), 4.36 (m, 2H, CH_2), 4.25 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, H7), 4.05 (td, $J = 6.2$ and 10.6 Hz, 1H, H1), 3.66 (s, 3H, OCH_3), 3.60 (dd, $J = 4.0$ and 11.0 Hz, 1H, H6), 3.18 (m, 6H, $2\times\text{OCH}_3$), 2.74 (dd, $J = 6.1$ and 17.8 Hz, 1H, CHH-10), 2.44 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.14 (ddd, $J = 2.6$, 10.2 and 17.8 Hz, 1H, CHH-10), 1.24 (s, 3H, CH_3) and 1.21 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 166.4 (C), 134.1 (CH), 131.5 (C), 99.5 (C), 98.9 (C), 80.2 (C), 74.7 (CH), 71.5 (CH), 70.7 (CH), 62.7 (CH), 58.7 (CH_2), 52.0 (OCH_3), 47.9 (OCH_3), 47.8 (OCH_3), 30.2 (CH_2), 17.8 (CH_3) and 17.7 (CH_3) ppm. IR (ATR) ν : 1716 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 363$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{Na}$ (MNa^+): 363.1414; found, 363.1420.

5.34 General procedure for 1,3-dipolar cycloaddition reaction

A stirred solution of the alkyne **89** (1 mmol) and benzyl azide (1 mmol) in a 1:1 mixture of $t\text{BuOH}$ -water (5 mL) was treated with a freshly prepared aqueous sodium ascorbate solution (1.0 M), followed by aqueous copper(II) sulfate solution (0.32 M). The resultant heterogeneous mixture was stirred vigorously during 18 h at room temperature and then diluted with water and ethyl acetate. The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate ($\times 2$). The combined organic extracts were dried (anh. Na_2SO_4), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography to afford the triazoles **90**.

5.34.1 Methyl (1*R*,3*R*,4*S*,6*R*,7*S*)-3,4-dimethyl-7-[(1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)]methoxy-3,4-dimethoxy-2,5-dioxabicyclo[4.4.0]dec-8-en-9-carboxylate (90a)

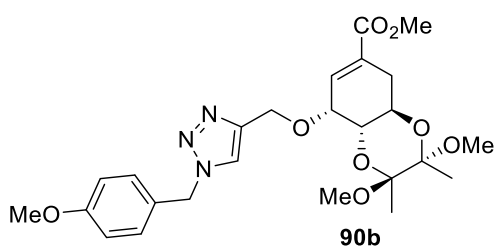


It was prepared following the 1,3-dipolar cycloaddition reaction procedure using the alkyne **89** (182 mg, 0.54 mmol), benzyl azide (0.07 mL, 0.54 mmol), a 1:1 mixture of *t*BuOH-water (2.7 mL), aqueous sodium ascorbate solution (0.54 mL, 1.0

M), aqueous copper(II) sulfate solution (1.7 mL, 0.32 M). Eluent for chromatography = (50:50) ethyl acetate/hexane. Yield = 45% (214 mg). Yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = +2.6^\circ$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.67 (s, 1H, ArH), 7.32 (m, 3H, 3×ArH), 7.25 (m, 2H, 2×ArH), 6.77 (dd, *J* = 2.4 and 5.2 Hz, 1H, H2), 5.48 (s, 2H, NCH₂), 4.96 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, OCHH), 4.88 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, OCHH), 4.19 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H, H7), 4.10 (m, 1H, H1), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.64 (dd, *J* = 4.0 and 11.0 Hz, 1H, H6), 3.20 (s, 3H, OCH₃), 3.15 (s, 3H, OCH₃), 2.76 (dd, *J* = 6.0 and 17.7 Hz, 1H, CHH-10), 2.18 (m, 1H, CHH-10), 1.25 (s, 3H, CH₃) and 1.19 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 166.4 (C), 146.7 (C), 134.8 (C), 134.0 (CH), 131.3 (C), 129.0 (2×CH), 128.5 (CH), 127.9 (2×CH), 122.8 (CH), 99.5 (C), 99.1 (C), 72.4 (CH), 71.8 (CH), 66.0 (OCH₂), 62.8 (CH), 54.1 (CH₂), 51.8 (OCH₃), 47.8 (OCH₃), 47.7 (OCH₃), 30.3 (CH₂), 17.8 (CH₃) and 17.7 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 1716 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) *m/z* = 496 (MNa⁺). HRMS calcd for C₂₄H₃₁N₃O₇Na (MNa⁺): 496.2048; found, 496.2054.

5.34.2 Methyl (1*R*,3*S*,4*S*,6*R*,7*R*)-3,4-dimethoxy-7-[(1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy]-3,4-dimethyl-2,5-dioxabicyclo[4.4.0]dec-8-en-9-carboxylate (90b)

It was prepared following the click reaction procedure using the alkyne **89** (101 mg, 0.30 mmol), 4-methoxybenzyl azide (48 mg, 0.30 mmol), a (1:1) mixture of *t*BuOH-water (1.5 mL), aqueous solution of sodium ascorbate (0.3 mL, 1.0 M), aqueous



solution of copper(II) sulfate (0.9 mL, 0.32 M).

Eluent for chromatography = ethyl acetate.

Yield = 81% (122 mg). Yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = 6.3^\circ$

(c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.64

(br s, 1H, ArH), 7.20 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2×ArH),

6.86 (dd, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2×ArH), 6.77 (dd, $J = 2.4$ and 5.1 Hz, 1H, H8), 5.42 (s, 2H,

NCH₂), 4.96 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, OCHH), 4.87 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, OCHH), 4.19 (t, $J =$

4.6 Hz, 1H, H7), 4.10 (dt, $J = 6.1$ and 10.5 Hz, 1H, H1), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.70 (s, 3H,

OCH₃), 3.64 (dd, $J = 3.9$ and 10.5 Hz, 1H, H6), 3.21 (s, 3H, OCH₃), 3.18 (s, 3H, OCH₃),

2.77 (dd, $J = 6.0$ and 17.7 Hz, 1H, CHH-10), 2.19 (ddd, $J = 2.8, 10.9$ and 18.4 Hz, 1H,

CHH-10), 1.26 (s, 3H, CH₃) and 1.21 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ :

166.6 (C), 160.2 (C), 134.2 (CH), 131.4 (C), 129.7 (2×CH), 127.0 (C), 114.7 (2×CH+C),

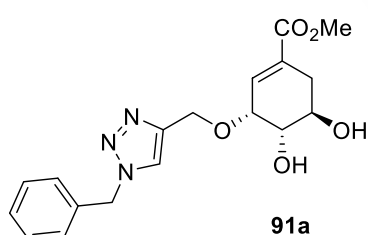
99.7 (C), 99.2 (C), 72.5 (CH), 72.0 (CH), 66.2 (OCH₂), 63.0 (CH), 55.4 (CH), 53.8 (CH₂),

52.0 (OCH₃), 48.0 (OCH₃), 47.9 (2×OCH₃), 30.5 (CH₂), 18.0 (CH₃) and 17.8 (CH₃) ppm.

FTIR (ATR) ν : 1716 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 526$ (MNa⁺). HRMS calcd for

C₂₅H₃₃N₃O₈Na (MNa⁺): 526.2160; found, 526.2154.

5.35 Methyl (3*R*,4*S*,5*R*)-3-(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy-4,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (91a)



It was prepared following the bisacetal deprotection

procedure described for the compounds **82** using the

acetal **90a** (224 mg, 0.47 mmol), (20:1) TFA/H₂O (1 mL).

Reaction temperature = 0 °C. Eluent for

chromatography = (5:95) methanol/diethyl ether. Yield = 69% (117 mg). Colorless

oil. $[\alpha]_D^{20} = -119.9^\circ$ (c1.2, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.45 (br s, 1H, ArH),

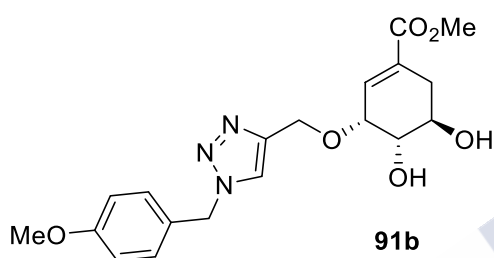
7.37–7.36 (m, 3H, 3×ArH), 7.27–7.25 (m, 2H, 2×ArH), 6.90 (m, 1H, H2), 5.50 (s, 2H,

PhCH₂), 4.82 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, OCHH), 4.74 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, OCHH), 4.29 (t, $J =$

4.1 Hz, 1H, H3), 4.03 (m, 1H, H4), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.74–3.71 (m, 1H, H5), 2.92

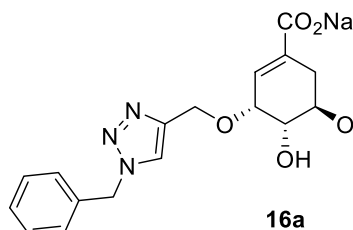
(dd, $J = 4.7$ and 18.1 Hz, 1H, CHH-6) and 2.22 (dd, $J = 8.5$ and 18.5 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 166.6 (C), 144.8 (C), 134.4 (C), 133.5 (CH), 132.0 (C), 129.1 (2 \times CH), 128.8 (CH), 128.2 (2 \times CH), 122.8 (CH), 73.4 (CH), 72.6 (CH), 66.5 (CH), 63.2 (CH_2), 54.2 (CH_2), 52.1 (OCH_3) and 32.5 (CH_2) ppm. FTIR (ATR) ν : 3378 (OH), 1707 and 1674 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 382$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ (MNa^+): 382.1373; found, 382.1384.

5.36 Methyl (3*R*,4*S*,5*R*)-3-(1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy-4,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (91b)



It was prepared following the bisacetal deprotection procedure described for the compounds **82** using the acetal **90b** (132 mg, 0.26 mmol), (20:1) TFA/ H_2O (0.5 mL). Eluent for chromatography = (5:95) methanol/diethyl ether. Yield = 66% (67 mg). Yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = -127.2^\circ$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.41 (br s, 1H, ArH), 7.23 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 \times ArH), 6.89 (m, 3H, 2 \times ArH+H2), 5.45 (s, 2H, NCH_2), 4.82 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, OCHH), 4.78 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, OCHH), 4.28 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H, H3), 3.99 (m, 1H, H5), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.68 (dd, $J = 3.8$ and 9.2 Hz, 1H, H4), 2.91 (dd, $J = 4.7$ and 18.8 Hz, 1H, CHH-6), 2.72 (br s, 2H, 2 \times OH) and 2.21 (dd, $J = 8.4$ and 18.8 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 166.7 (C), 160.0 (C), 144.9 (C), 133.7 (CH), 131.9 (C), 129.9 (2 \times CH), 126.4 (C), 122.6 (CH), 114.6 (2 \times CH), 73.6 (CH), 72.4 (CH), 66.8 (CH), 63.3 (CH_2), 55.4 (OCH_3), 53.9 (CH_2), 52.1 (OCH_3) and 32.3 (CH_2) ppm. FTIR (ATR): 3385 (OH), 1707 and 1674 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 412$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}$ (MNa^+): 412.1479; found, 412.1487.

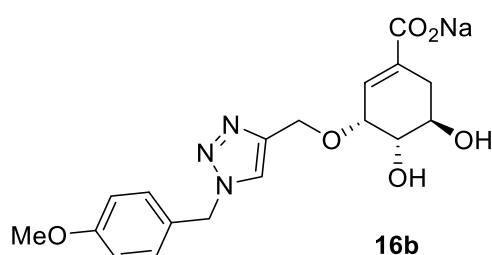
5.37 Sodium (3*R*,4*S*,5*R*)-3-(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy-4,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (16a)



It was prepared following the general procedure for the synthesis of carboxylic acids as sodium salts using methyl ester **91a** (116 mg, 0.32 mmol), aqueous solution of NaOH (0.6 mL, 1 M), THF (3 mL). Yield = 89% (104 mg). White foam. $[\alpha]_D^{20} = -88.2^\circ$ (c1.2, H₂O). ¹H

NMR (250 MHz, D₂O) δ : 7.68 (s, 1H, ArH), 7.07 (m, 3H, 3×ArH), 6.98 (m, 2H, 2×ArH), 6.13 (m, 1H, H₂), 5.22 (s, 2H, CH₂), 4.49 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, OCHH), 4.42 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, OCHH), 3.96 (t, $J = 3.7$ Hz, 1H, H₃), 3.71 (m, 1H, H₄), 3.52 (dd, $J = 4.1$ and 8.5 Hz, 1H, H₅), 2.44 (dd, $J = 5.1$ and 18.2 Hz, 1H, CHH-6) and 1.90 (dd, $J = 6.6$ and 18.2 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, D₂O) δ : 175.6 (C), 145.1 (C), 137.0 (C), 135.3 (C), 129.7 (CH), 129.3 (CH), 128.6 (CH), 125.7 (CH), 74.7 (CH), 71.2 (CH), 67.6 (CH), 63.0 (CH₂), 54.4 (CH₂) and 32.8 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3338 (OH) and 1678 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 344$ (M-Na). HRMS calcd for C₁₇H₁₈N₃O₅ (M-Na): 344.1252; found, 344.1251.

5.38 Sodium (3*R*,4*S*,5*R*)-3-[1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]methoxy-4,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (16b)

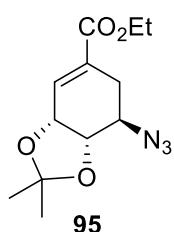


It was prepared following the general procedure for the synthesis of carboxylic acids as sodium salts using the methyl ester **91b** (47 mg, 0.12 mmol), aqueous NaOH (0.2 mL, 0.5 M), THF (1 mL). Yield = 99% (47 mg). White

foam. $[\alpha]_D^{20} = -20.7^\circ$ (c1.3, H₂O). ¹H NMR (250 MHz, D₂O) δ : 7.68 (s, 1H, ArH), 6.96 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, 2×ArH), 6.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, 2×ArH), 6.13 (m, 1H, H₂), 5.16 (s, 2H, CH₂), 4.50 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, OCHH), 4.44 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, OCHH), 3.96 (t, $J = 4.2$ Hz, 1H, H₃), 3.72 (dd, $J = 6.9$ and 14.3 Hz, 1H, H₄), 3.53 (dd, $J = 4.1$ and 8.6 Hz,

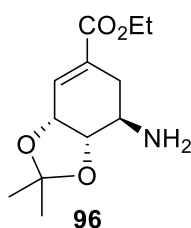
1H, H5), 3.47 (s, 3H, OCH₃), 2.45 (dd, J = 5.3 and 18.1 Hz, 1H, CHH-6) and 1.90 (dd, J = 6.8 and 18.6 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, D₂O) δ : 175.5 (C), 159.5 (C), 145.1 (C), 137.1 (C), 130.3 (2 \times CH), 129.2 (CH), 127.8 (C), 125.3 (CH), 114.9 (2 \times CH), 74.7 (CH), 71.2 (CH), 67.6 (CH), 63.0 (CH₂), 55.8 (OCH₃), 53.9 (CH₂) and 32.8 (CH₂) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, D₂O) δ : 175.5 (C), 159.5 (C), 145.1 (C), 137.1 (C), 130.3 (2 \times CH), 129.2 (CH), 127.8 (C), 125.3 (CH), 114.9 (2 \times CH), 74.7 (CH), 71.2 (CH), 67.6 (CH), 63.0 (CH₂), 55.8 (OCH₃), 53.9 (CH₂) and 32.8 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3351 (OH) and 1417 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 374 (M-Na). HRMS calcd for C₁₈H₂₀N₃O₆ (M-Na): 374.1358; found, 374.1351.

5.39 Ethyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-azido-3,4-(*O*-isopropyliden)cyclohex-1-ene-1-carboxylate (95)



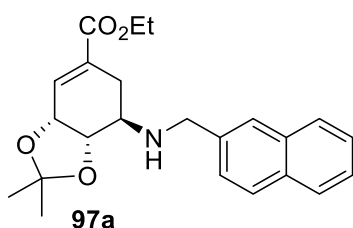
It was prepared following the protection procedure for the synthesis of compound **70** using the diol **94** (1.36 g, 5.99 mmol), 2,2-dimethoxypropane (15 mL, 124.59 mmol), camphorsulphonic acid (28 mg, 0.12 mmol). Eluent for chromatography = (20:80) ethyl acetate/hexane. Yield = 75% (1.20 g). Yellow oil. $[\alpha]_D^{20}$ = -108.2° (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.90 (ddd, J = 1.1, 2.3 and 3.5 Hz, 1H, H2), 4.67 (m, 1H, H3), 4.19 (q, J = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 4.09 (dd, J = 6.2 and 8.1 Hz, 1H, H4), 3.62 (dt, J = 4.7 and 8.9 Hz, 1H, H5), 2.76 (br dd, J = 4.7 and 17.6 Hz, 1H, CHH-6), 2.17 (dddd, J = 1.7, 2.3, 9.2 and 17.6 Hz, 1H, CHH-6), 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.37 (s, 3H, CH₃) and 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 165.6 (C), 133.7 (CH), 131.0 (C), 110.1 (C), 76.6 (CH), 71.8 (CH), 61.2 (OCH₂), 59.6 (CH), 28.0 (CH₃), 27.1 (CH₂), 25.8 (CH₃) and 14.2 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 2102 (N₃) and 1713 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 290 (MNa⁺). HMRS calcd for C₁₂H₁₇N₃O₄Na (MNa⁺): 290.1111; found, 290.1114.

5.40 Ethyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-amino-3,4-(*O*-isopropyliden)cyclohex-1-ene-1-carboxylate (**96**)



It was prepared following the Staudinger procedure for the synthesis of compound **71** using the azide **95** (291 mg, 1.09 mmol), triphenylphosphine (315 mg, 1.19 mmol), water (270 μ L), THF (27 mL). Eluent for chromatography = (5:95) methanol/dichloromethane. Yield = 46% (120 mg). Yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = -88.3^\circ$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.77 (ddd, $J = 1.0, 2.3$ and 3.5 Hz, 1H, H2), 4.54 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, H3), 4.06 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3.78 (dd, $J = 6.2$ and 8.2 Hz, 1H, H4), 2.87 (dt, $J = 4.5$ and 8.6 Hz, 1H, H5), 2.56 (dd, $J = 4.6$ and 17.4 Hz, 1H, CHH-6), 1.89 (tdd, $J = 1.9, 9.0$ and 17.5 Hz, 1H, CHH-6), 1.57 (br s, 2H, NH_2), 1.29 (s, 3H, CH_3), 1.24 (s, 3H, CH_3) and 1.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 165.9 (C), 133.3 (CH), 132.0 (C), 109.1 (C), 79.3 (CH), 71.6 (CH), 60.7 (OCH_2), 49.5 (CH), 30.1 (CH_2), 27.9 (CH_3), 25.6 (CH_3) and 14.0 (CH_3) ppm. FTIR (ATR) ν : 1709 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 242$ (MH^+). HMRS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{NO}_4$ (MH^+): 242.1387; found, 242.1388.

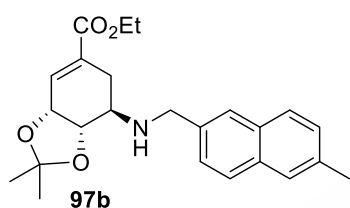
5.41 Ethyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-(*N*-(naphth-2-yl)methyl)amino-3,4-*O*-isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (**97a**)



It was prepared following the general reductive amination procedure using the amine **96** (215 mg, 0.89 mmol), 4 Å molecular sieves (215 mg), sodium acetate (148 mg, 1.78 mmol), 2-naphthaldehyde (141 mg, 0.89 mmol), sodium cyanoborohydride (113 mg, 1.78 mmol), ethanol (5 mL). Eluent for chromatography = (30:70) ethyl acetate/hexane. Yield = 55% (171 mg). Colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = -130.0^\circ$ (c 1.1, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.84–7.78 (m, 4H, 4 \times ArH), 7.48–7.46 (m, 3H, 3 \times ArH), 6.95 (br s, 1H, H2), 4.70 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, H3), 4.25 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 4.14 (m, 2H, $\text{NCHHAr} + \text{H4}$), 4.00 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H,

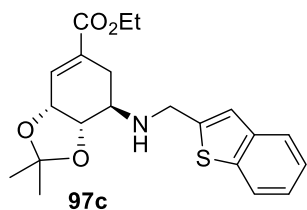
NCHHAr), 2.91 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H, H5), 2.87 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H, CHH-6), 2.10 (m, 2H, NH+CHH-6), 1.41 (s, 3H, CH₃), 1.37 (s, 3H, CH₃) and 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 166.1 (C), 137.5 (C), 133.4 (CH), 133.3 (C), 132.5 (C), 131.9 (C), 128.0 (CH), 127.5 (CH), 127.5 (CH), 126.3 (CH), 126.2 (CH), 125.9 (CH), 125.4 (CH), 109.2 (C), 77.6 (CH), 71.7 (CH), 60.8 (OCH₂), 54.6 (CH), 51.4 (CH₂), 27.9 (CH₃), 27.3 (CH₂), 25.8 (CH₃) and 14.0 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3405 (NH) and 1704 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 382$ (MH⁺). HRMS calcd for C₂₃H₂₈NO₄ (MH⁺): 382.2013; found, 382.2014.

5.42 Ethyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-[*N*-(6-methylnaphth-2-yl)methyl]amino-3,4-*O*-isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (97b)



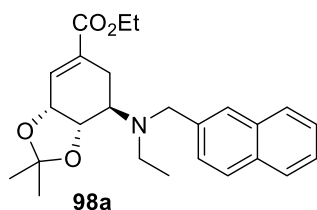
It was prepared following the general reductive amination procedure using the amine **96** (160 mg, 0.66 mmol), 4 Å molecular sieves (160 mg), sodium acetate (108 mg, 1.30 mmol), 6-methyl-2-naphthaldehyde (113 mg, 0.66 mmol), sodium cyanoborohydride (82 mg, 1.30 mmol), ethanol (3.3 mL). Eluent for chromatography = (30:70) ethyl acetate/hexane. Yield = 52% (136 mg). Yellow oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -94.8^\circ$ (c 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.70 (m, 3H, 3×ArH), 7.58 (s, 1H, ArH), 7.41 (dd, $J = 8.5$ and 1.3 Hz, 1H, ArH), 7.29 (dd, $J = 8.5$ and 1.3 Hz, 1H, ArH), 6.92 (m, 1H, H2), 4.67 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H, H3), 4.21 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 4.11 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H, NCHHAr), 4.09 (m, 1H, H4), 3.94 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H, NCHHAr), 2.87 (m, 2H, H5+CHH-6), 2.07 (m, 1H, CHH-6), 1.98 (br s, 1H, NH), 1.38 (s, 3H, CH₃), 1.35 (s, 3H, CH₃) and 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 166.3 (C), 136.6 (C), 135.2 (C), 133.6 (CH), 132.9 (C), 132.2 (C), 131.7 (C), 128.3 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 126.7 (CH), 126.5 (CH), 126.2 (CH), 109.5 (C), 77.7 (CH), 71.9 (CH), 61.0 (OCH₂), 54.8 (CH), 51.6 (CH₂), 28.1 (CH₃), 27.5 (CH₂), 26.0 (CH₃), 21.7 (CH₃) and 14.2 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 2983 (NH) and 1711 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 396$ (MH⁺). HRMS calcd for C₂₄H₃₀NO₄ (MH⁺): 396.2169; found, 396.2169.

5.43 Ethyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-[*N*-(benzothiophen-2-yl)methyl]amino-3,4-*O*-isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (97c)



It was prepared following the general reductive amination procedure using the amine **96** (177 mg, 0.73 mmol), 4 Å molecular sieves (177 mg), sodium acetate (120 mg, 1.50 mmol), 2-benzothiophenecarbaldehyde (119 mg, 0.73 mmol), sodium cyanoborohydride (94 mg, 1.5 mmol), ethanol (3.7 mL). Eluent for chromatography = (20:80) ethyl acetate/hexane. Yield = 52% (147 mg). Colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = -90.0^\circ$ (c1.2, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.76 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, ArH), 7.66 (br d, *J* = 8.3 Hz, 1H, ArH), 7.32–7.22 (m, 2H, 2×ArH), 7.14 (s, 1H, ArH), 6.92 (m, 1H, H2), 4.66 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, H3), 4.23–4.14 (m, 5H, OCH₂+NCH₂), 4.07 (dd, *J* = 7.7 and 6.3 Hz, 1H, H4), 2.92 (dt, *J* = 8.4 and 4.4 Hz, 1H, H5), 2.82 (dd, *J* = 17.3 and 4.4 Hz, 1H, CHH-6), 2.07 (m, 1H, CHH-6), 1.92 (br s, 1H, NH), 1.37 (s, 6H, 2×CH₃) and 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ : 166.2 (C), 145.1 (C), 139.7 (C), 139.6 (C), 133.6 (CH), 131.9 (C), 124.1 (CH), 123.8 (CH), 123.1 (CH), 122.3 (CH), 121.3 (CH), 109.4 (C), 77.7 (CH), 71.8 (CH), 60.9 (OCH₂), 54.5 (CH), 46.8 (CH₂), 28.0 (CH₃), 27.3 (CH₂), 25.9 (CH₃) and 14.2 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3346 (NH) and 1697 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) *m/z* = 388 (MH⁺). HRMS calcd for C₂₁H₂₆NO₄S (MH⁺): 388.1577; found, 388.1577.

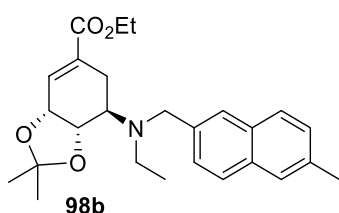
5.44 Ethyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-[*N,N*-ethyl(naphth-2-ylmethyl)]amino-3,4-*O*-isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (98a)



It was prepared following the general reductive amination procedure using the amine **97a** (173 mg, 0.46 mmol), 4 Å molecular sieves (173 mg), sodium acetate (113 mg, 0.88 mmol), acetaldehyde (0.05 mL, 0.59 mmol), sodium cyanoborohydride (58 mg, 0.59 mmol), methanol (2.3 mL). Eluent for chromatography = (20:80) ethyl acetate/hexane. Yield = 53% (100 mg). Yellow oil.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -95.5^\circ$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.79 (m, 4H, 4 \times ArH), 7.58 (dd, J = 1.5 and 8.3 Hz, 1H, ArH), 7.43 (m, 2H, 2 \times ArH), 6.87 (m, 1H, H2), 4.70 (m, 1H, H3), 4.36 (dd, J = 6.6 and 9.0 Hz, 1H, H4), 4.23 (dd, J = 7.1 and 1.5 Hz, 1H, OCHHCH₃), 4.18 (dd, J = 7.1 and 1.5 Hz, 1H, OCHHCH₃), 4.02 (d, J = 14.4 Hz, 1H, NCHH), 3.86 (d, J = 14.4 Hz, 1H, NCHH), 2.97 (m, 1H, H5), 2.85–2.60 (m, 3H, NCH₂+CHH-6), 2.21 (m, 1H, CHH-6), 1.41 (s, 3H, CH₃), 1.38 (s, 3H, CH₃), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃) and 1.09 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 166.4 (C), 138.6 (C), 133.6 (C), 133.5 (C), 133.3 (CH), 132.9 (C), 127.9 (CH), 127.8 (2 \times CH), 127.2 (CH), 126.8 (CH), 125.9 (CH), 125.4 (CH), 109.0 (C), 75.0 (CH), 72.9 (CH), 61.1 (OCH₂), 57.4 (CH), 55.1 (CH₂), 44.5 (CH₂), 28.0 (CH₃), 25.8 (CH₃), 24.9 (CH₂), 14.3 (CH₃) and 14.2 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 1720 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) m/z = 410 (MH^+). HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{NO}_4$ (MH^+): 410.2327; found, 410.2326.

5.45 Ethyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-[*N,N*-ethyl(6-methylnaphth-2-yl)methyl]amino-3,4-*O*-isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (**98b**)



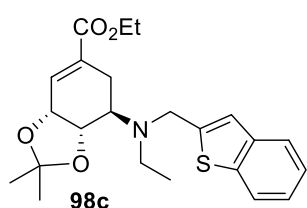
It was prepared following the general reductive amination procedure using the amine **97b** (192 mg, 0.48 mmol), 4 Å molecular sieves (192 mg), sodium acetate (118 mg, 1.44 mmol), acetaldehyde (0.05 mL, 0.59 mmol)

and sodium cyanoborohydride (60 mg, 0.59 mmol), ethanol (2.4 mL). Eluent for chromatography = (20:80) ethyl acetate/hexane. Yield = 44% (89 mg). Yellow oil.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -71.9^\circ$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 7.73 (br s, 1H, ArH), 7.70 (s, 1H, ArH), 7.67 (s, 1H, ArH), 7.57 (br s, 1H, ArH), 7.52 (dd, J = 1.3 and 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.30–7.26 (m, 1H, ArH), 6.86 (m, 1H, H2), 4.70 (m, 1H, H3), 4.35 (dd, J = 6.6 and 9.0 Hz, 1H, H4), 4.23 (dd, J = 1.1 and 7.2 Hz, 1H, OCHHCH₃), 4.17 (dd, J = 1.1 and 7.2 Hz, 1H, OCHHCH₃), 3.98 (d, J = 14.2 Hz, 1H, NCHH), 3.82 (d, J = 14.2 Hz, 1H, NCHH), 2.96 (td, J = 4.7 and 9.9 Hz, 1H, H5), 2.82–2.59 (m, 3H, NCH₂+CHH-6), 2.49 (s, 3H, CH₃), 2.26–2.13 (m, 1H, CHH-6), 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.36 (s, 3H, CH₃), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃) and 1.08 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ :

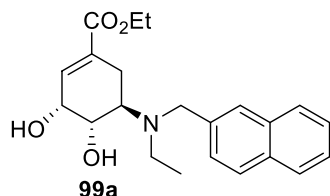
166.1 (C), 137.3 (C), 134.7 (C), 133.4 (C), 133.1 (CH), 132.8 (C), 131.4 (C), 127.9 (CH), 127.3 (CH), 127.0 (2×CH), 126.5 (CH), 126.4 (CH), 108.8 (C), 74.7 (CH), 72.6 (CH), 60.8 (OCH₂), 57.0 (CH), 54.8 (CH₂), 44.2 (CH₂), 27.8 (CH₃), 25.6 (CH₃), 24.6 (CH₂), 21.5 (CH₃), 14.1 (CH₃) and 14.0 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 1710 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 424 (MH⁺). HRMS calcd for C₂₆H₃₄NO₄ (MH⁺): 424.2482; found, 424.2484.

5.46 Ethyl (3*R*,4*S*,5*R*)-5-[*N,N*-(benzothiophen-2-ylmethyl)ethyl]amino-3,4-*O*-isopropylidendioxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (**98c**)



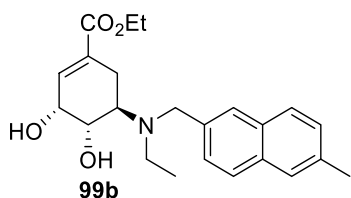
It was prepared following the general reductive amination procedure using the amine **97c** (150 mg, 0.39 mmol), 4 Å molecular sieves (150 mg), sodium acetate (96 mg, 1.20 mmol), acetaldehyde (0.05 mL, 0.80 mmol), sodium cyanoborohydride (49 mg, 0.80 mmol), methanol (1.9 mL). Eluent chromatography = (20:80) ethyl acetate/hexane. Yield = 59% (96 mg). Colorless oil. $[\alpha]_D^{20}$ = -54.1° (c1.1, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.77 (d, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 7.65 (br d, J = 7.9 Hz, 1H, ArH), 7.32–7.21 (m, 2H, 2×ArH), 7.15 (s, 1H, ArH), 6.86 (m, 1H, H₂), 4.71 (m, 1H, H₃), 4.34 (dd, J = 8.8 and 6.6 Hz, 1H, H₄), 4.24–4.16 (m, 3H, OCH₂+NCHHAr), 4.00 (d, J = 15.0 Hz, 1H, NCHHAr), 3.02 (dt, J = 9.8 and 4.7 Hz, 1H, H₅), 2.85–2.67 (m, 3H, NCH₂+CHH-6), 2.19 (m, 1H, CHH-6), 1.44 (s, 3H, CH₃), 1.41 (s, 3H, CH₃), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃) and 1.13 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 166.1 (C), 147.6 (C), 139.9 (C), 139.8 (C), 133.5 (C), 133.0 (CH), 123.9 (CH), 123.5 (CH), 122.8 (CH), 122.3 (CH), 120.7 (CH), 109.0 (C), 75.1 (CH), 72.7 (CH), 60.9 (OCH₂), 57.1 (CH), 50.7 (CH₂), 44.3 (CH₂), 28.0 (CH₃), 25.9 (CH₂), 25.7 (CH₃), 14.2 (CH₃) and 14.1 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 1704 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 416 (MH⁺). HRMS calcd for C₂₃H₃₀NO₄S (MH⁺): 416.1890; found, 416.1887.

5.47 Ethyl (3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-[*N,N*-ethyl(naft-2-ylmethyl)]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (99a)



It was prepared following the general acetal deprotection procedure described in compounds **40** using the acetal **98a** (60 mg, 0.15 mmol), HCl (0.03 mL, 6 M), ethanol (1.0 mL). Eluent chromatography = (70:30) ethyl acetate/hexane. Yield = 81% (45 mg). Yellow oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -176.2^{\circ}$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.81 (m, 3H, 3 \times ArH), 7.70 (s, 1H, ArH), 7.46 (m, 3H, 3 \times ArH), 6.92 (m, 1H, H2), 4.49 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, H3), 4.26 (dd, $J = 7.1$ and 1.2 Hz, 1H, OCHHCH₃), 4.21 (dd, $J = 7.1$ and 1.2 Hz, 1H, OCHHCH₃), 4.02 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H, NCHH), 3.64 (m, 2H, NCHH+H4), 3.21 (dt, $J = 4.9$ and 11.1 Hz, 1H, H5), 2.75 (m, 2H, NCHH+CHH-6), 2.58 (m, 1H, NCHH), 2.28 (m, 1H, CHH-6), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃) and 1.10 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 166.7 (C), 136.6 (C), 134.7 (CH), 133.4 (C), 133.1 (C), 132.9 (C), 128.5 (CH), 127.8 (2 \times CH), 127.6 (CH), 126.7 (CH), 126.2 (CH), 125.9 (CH), 68.2 (CH), 65.1 (CH), 61.1 (OCH₂), 54.8 (CH), 54.0 (CH₂), 43.9 (CH₂), 23.0 (CH₂), 14.3 (CH₃) and 14.3 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3398 (OH) and 1704 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 370$ (MH^+). HRMS calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NO}_4$ (MH^+): 370.2018; found, 370.2013.

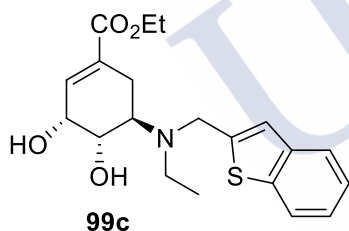
5.48 Ethyl (3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-[*N,N*-ethyl(6-methylnaft-2-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (99b)



It was prepared following the general acetal deprotection procedure described in compounds **40** using the acetal **98b** (89 mg, 0.21 mmol), HCl (0.04 mL, 6 M), ethanol (1.4 mL). Eluent chromatography = (80:20) ethyl acetate/hexane. Yield = 81% (64 mg). White foam. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -139.6^{\circ}$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.72 (m, 2H, 2 \times ArH), 7.65 (s, 1H, ArH), 7.59 (s, 1H, ArH), 7.41 (dd, $J = 1.3$ and 8.3 Hz, 1H, ArH), 7.31 (dd, $J = 1.3$ and 8.3 Hz, 1H, ArH),

6.92 (m, 1H, H2), 4.47 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, H3), 4.26 (dd, $J = 1.1$ and 7.1 Hz, 1H, OCHHCH₃), 4.22 (dd, $J = 0.9$ and 7.01 Hz, 1H, OCHHCH₃), 3.98 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H, NCHH), 3.65–3.57 (m, 2H, H4+NCHH), 3.20 (td, $J = 4.9$ and 11.1 Hz, 1H, H5), 2.97 (br s, 1H, OH), 2.82–2.66 (m, 2H, NCHH+CHH-6), 2.58 (m, 1H, NCHH), 2.50 (s, 3H, CH₃), 2.27 (m, 1H, CHH-6), 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃) and 1.09 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 166.6 (C), 135.6 (C), 135.4 (C), 134.6 (CH), 133.0 (2×C), 131.5 (C), 128.4 (CH), 127.7 (CH), 127.5 (CH), 127.2 (CH), 126.7 (CH), 126.7 (CH), 68.1 (CH), 65.0 (CH), 61.0 (OCH₂), 54.7 (CH), 53.9 (CH₂), 43.8 (CH₂), 22.9 (CH₂), 21.7 (CH₃), 14.2 (CH₃) and 14.2 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3419 (OH) and 1711 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 384$ (MH⁺). HRMS calcd for C₂₃H₃₀NO₄ (MH⁺): 384.2169; found, 384.2170.

5.49 Ethyl (3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-[*N,N*-ethyl(benzotiofen-2-ylmethyl)]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylate (99c)



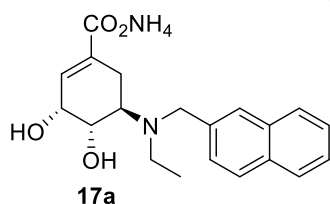
It was prepared following the general acetal deprotection procedure described in compounds **40** using the acetal **98c** (63 mg, 0.15 mmol), HCl (0.03 mL, 6 M), ethanol (1.0 mL). Eluent for chromatography = (70:30) ethyl acetate/hexane. Yield = 92% (52 mg). Colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = -140.7^\circ$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.78 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.67 (br d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.34–7.25 (m, 2H, 2×ArH), 7.14 (s, 1H, ArH), 6.92 (dd, $J = 2.2$ and 5.1 Hz, 1H, H2), 4.49 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, H3), 4.22 (dq, $J = 1.1$ and 7.2 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 4.06 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H, NCHHAr), 3.87 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H, NCHHAr), 3.64 (dd, $J = 4.2$ and 11.0 Hz, 1H, H4), 3.23 (dt, $J = 4.9$ and 11.0 Hz, 1H, H5), 2.96 (br s, 1H, OH), 2.76 (m, 2H, NCH₂CH₃), 2.60 (m, 1H, CHH-6), 2.21 (ddd, $J = 1.8, 11.2$ and 17.4 Hz, 1H, CHH-6), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃) and 1.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 166.6 (C), 145.1 (C), 139.8 (C), 139.7 (C), 134.8 (CH), 132.9 (C), 124.4 (CH), 124.2 (CH), 123.3 (CH), 122.5 (CH), 122.1 (CH), 68.4 (CH), 65.2 (CH), 61.1 (OCH₂), 54.8 (CH), 49.6 (CH₂), 44.0 (CH₂), 23.1 (CH₂), 14.3 (CH₃) and 14.3 (CH₃) ppm.

FTIR (ATR) ν : 3419 (OH) and 1704 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) m/z = 376 (MH^+). HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{NO}_4\text{S}$ (MH^+): 376.1577; found, 376.1577.

5.50 General procedure for ester hydrolysis in compounds **99**

A solution of the ethyl esters **99** (1.00 mmol) in tetrahydrofuran (10 mL) and NaOH (0.98 mmol, 1 M) was stirred at room temperature for 14 h and heated at 60 °C for 3 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with Milli-Q water and the organic solvent was removed under reduced pressure. The resulting aqueous solution was washed with diethyl ether (x2) and the aqueous solution was purified by an ion-exchange chromatography using DOWEX-50 W X 8-400 (NH_4^+). The fraction containing the product was freeze-dried to afford the ammonium salts **17**.

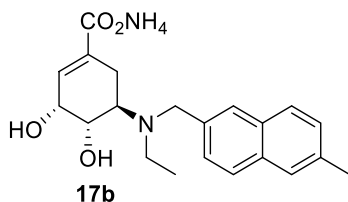
5.50.1 (3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-[*N,N*-ethyl(naft-2-ylmethyl)]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylic acid ammonium salt (**17a**)



It was prepared following the general hydrolysis procedure described in compounds **99** using the ethyl ester **99a** (76 mg, 0.2 mmol), NaOH (0.25 mL, 0.25 mmol, 1 M), tetrahydrofuran (2.1 mL). Yield = 69% (49 mg).

White solid. Mp: 133–135 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -156.0^\circ$ (c 1.0, H_2O). ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ : 7.96–7.88 (m, 3H, 3 \times ArH), 7.83 (br s, 1H, ArH), 7.54 (m, 2H, 2 \times ArH), 7.36 (d, J = 8.5 Hz, 1H, ArH), 6.49 (m, 1H, H2), 4.25 (t, J = 4.6 Hz, 1H, H3), 3.52 (m, 3H, H4+NCH₂), 3.21 (m, 1H, H5), 3.14 (m, 1H, NCHH), 3.00 (m, 1H, NCHH), 2.65 (dd, J = 17.0 and 5.0 Hz, 1H, CHH-6), 1.92 (m, 1H, CHH-6) and 1.05 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O) δ : 173.5 (C), 135.4 (C), 133.0 (C), 132.6 (C), 131.0 (CH), 130.0 (CH), 128.9 (CH), 127.9 (CH), 127.6 (2 \times CH), 127.5 (CH+C), 127.2 (CH), 66.7 (CH), 65.6 (CH), 55.9 (CH), 52.9 (CH₂), 46.2 (CH₂), 23.9 (CH₂) and 9.3 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3277 (OH) and 1563 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) m/z = 342 ($\text{M}-\text{NH}_4$). HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_4$ ($\text{M}-\text{NH}_4$): 342.1701; found, 342.1700.

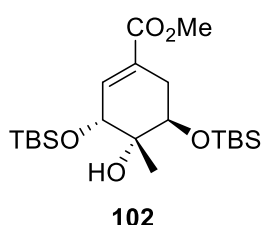
5.50.2 (3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-[N,N-ethyl(6-methylnaft-2-yl)methyl]aminocyclohex-1-ene-1-carboxylic acid ammonium salt (17b)



It was prepared following the general hydrolysis procedure described in compounds **99** using the ester **99b** (41 mg, 0.11 mmol), NaOH (0.2 mL, 0.22 mmol, 1 M), tetrahydrofuran (1.1 mL). Yield = (27 mg, 66%).

White solid. Mp: 138–140 °C. $[\alpha]_D^{20} = -115.4^\circ$ (c0.5, H₂O). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.95 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, ArH), 7.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.89 (s, 1H, ArH), 7.77 (s, 1H, ArH), 7.49 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, ArH), 7.44 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, ArH), 6.58 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, H₂), 4.34 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, H₃), 3.65 (br s, 2H, NCH₂), 3.56 (td, $J = 4.8$ and 11.7 Hz, 1H, H₄), 3.37 (m, 1H, H₅), 3.21 (m, 1H, NCHH), 3.09 (m, 1H, NCHH), 2.74 (dd, $J = 3.9$ and 16.0 Hz, 1H, CHH-6), 2.52 (s, 3H, CH₃), 2.13 (m, 1H, CHH-6) and 1.15 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 174.7 (C), 138.8 (C), 137.0 (C), 134.3 (C), 132.0 (C), 131.4 (CH), 130.8 (CH), 130.3 (CH), 129.1 (CH), 128.8 (CH), 128.7 (CH), 127.4 (CH+C), 68.0 (CH), 66.7 (CH), 56.7 (CH), 54.1 (CH₂), 47.0 (CH₂), 25.2 (CH₂), 21.8 (CH₃) and 10.8 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3236 (OH) and 1560 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 356$ [(M-NH₄+2H)⁺]. HRMS calcd for C₂₁H₂₆NO₄ [(M-NH₄+2H)⁺]: 356.1856; found, 356.1855.

5.51 Methyl (3R,4S,5R)-3,5-bis(tert-butyldimethylsilyloxy)-4-hydroxy-4-methylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (102)

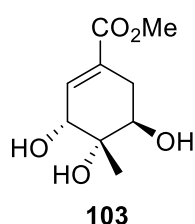


A solution of alcohol **101**¹⁰² (445 mg, 1.07 mmol) in dry dichloromethane (7 mL), under argon and at room temperature, was treated with Dess-Martin periodinane (683 mg, 1.61 mmol) and the resulting solution was stirred for 18 h.

Diethyl ether was added and the organic solution was successively washed with saturated Na₂S₂O₃ and NaHCO₃. The combined aqueous layers were extracted with diethyl ether (×2). The combined organic extracts were dried (anh. Na₂SO₄), filtered

and concentrated under reduced pressure. A solution of the reaction crude in dry THF (6 mL), under argon and at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, was treated with a solution of methylmagnesium bromide (0.36 mL, 1.07 mmol, *ca* 3.0 M in diethyl ether). The dry ice bath was then removed and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h and then diluted with saturated ammonium chloride and then diethyl ether. The aqueous layer was separated and the organic layer was washed, successively, with saturated NH_4Cl and HCl (10%). The organic extract was dried (anh. Na_2SO_4), filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel, eluting with (5:95) diethyl ether/hexane, to give the compound **102** (223 mg, 48%), as a colorless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -73.8^{\circ}$ (*c*1.0, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.62 (br s, 1H, H2), 4.21 (br s, 1H, H3), 3.93 (t, $J = 3.8$ Hz, 1H, H5), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 2.69 (dq, $J = 2.4$ and 18.2 Hz, 1H, CHH-6), 2.46 (br s, 1H, OH), 2.25 (dd, $J = 3.7$ and 18.2 Hz, 1H, CHH-6), 1.20 (s, 3H, CH_3), 0.92 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.84 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.16 (s, 3H, CH_3), 0.12 (s, 3H, CH_3), 0.07 (s, 3H, CH_3) and 0.05 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 167.5 (C), 137.9 (CH), 128.8 (C), 72.6 (CH), 72.2 (C), 71.7 (CH), 52.0 (OCH_3), 31.1 (CH_2), 26.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 22.8 (CH_3), 18.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 18.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), -4.0 (CH_3), -4.3 (CH_3), -4.8 (CH_3) and -4.8 (CH_3) ppm. FTIR (ATR) ν : 3566 (OH) and 1717 (CO) cm^{-1} . MS (ESI) $m/z = 453$ (MNa^+). HRMS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{O}_5\text{Si}_2\text{Na}$ (MNa^+): 453.2463; found, 453.2460.

5.52 Methyl (3*R*,4*S*,5*R*)-3,4,5-trihydroxy-4-methylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (**103**)

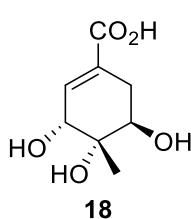


A solution of the silyl ether **102** (86 mg, 0.20 mmol) in HCl/MeOH (4 mL, 5%) was stirred at room temperature for 2 h. The solvent was concentrated under reduced pressure and the resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with dichloromethane, to

afford the triol **103** (42 mg, 99%) as a colorless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -88.3^{\circ}$ (*c*1.0, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.81 (m, 1H, H2), 4.15 (m, 1H, H3), 3.95 (dd, $J = 4.8$ and

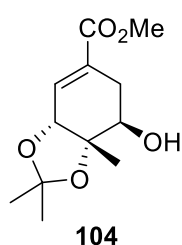
5.9 Hz, 1H, H5), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 2.71 (tdd, $J = 1.7, 4.5$ and 18.2 Hz, 1H, CHH-6), 2.50 (br s, 2H, 2×OH), (tdd, $J = 1.4, 5.9$ and 18.2 Hz, 1H, CHH-6) and 1.21 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.2 (C), 136.8 (CH), 130.7 (C), 73.4 (CH), 71.2 (CH), 69.2 (C), 52.3 (OCH₃), 31.7 (CH₂) and 18.2 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3392 (OH) and 1702 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 225$ (MNa⁺). HRMS calcd for C₉H₁₄O₅Na (MNa⁺): 225.0733; found, 225.0725.

5.53 (3R,4S,5R)-3,4,5-Trihydroxy-4-methylcyclohex-1-ene-1-carboxylic acid (18)



It was prepared following the general basic hydrolysis procedure described for synthesis of compounds **10** using methyl ester **103** (32 mg, 0.16 mmol), LiOH (0.6 mL, 1.60 mmol, 2.5 M) and THF (1.6 mL). Reaction time = 3 h. Yield = 96% (29 mg). White foam. $[\alpha]_D^{20} = -145.0^\circ$ (c1.0, H₂O). ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ : 6.59 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H, H2), 4.10 (m, 1H, H3), 3.90 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, H5), 2.69 (m, 1H, CHH-6), 2.19 (dd, $J = 6.0$ and 18.4 Hz, 1H, CHH-6) and 1.17 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ : 172.5 (C), 135.0 (CH), 132.3 (C), 72.6 (C), 70.3 (CH), 70.1 (CH), 31.0 (CH₂) and 18.7 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3314 (OH) and 1695 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) $m/z = 187$ (M-H). HRMS calcd for C₈H₁₁O₅ (M-H): 187.0612; found, 187.0611.

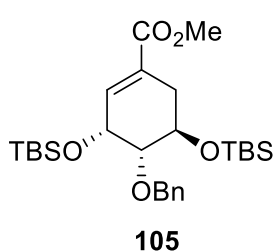
5.54 Methyl (3R,4S,5R)-5-hydroxy-3,4-O-isopropylidendioxy-4-methylcyclohex-1-ene-1-carboxylate (104)



It was prepared following the acetal protection procedure described for synthesis of compound **70** using the triol **103** (68 mg, 0.34 mmol), camphorsulfonic acid (3.2 mg, 0.01 mmol), 2,2-dimethoxypropane (0.9 mL, 6.97 mmol). Reaction time = 45 min. Eluent for chromatography = dichloromethane. Yield = 77%, (63 mg). Colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = -51.9^\circ$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.24 (br s, 1H, H2), 3.73 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H, H3), 3.23 (dd, $J = 5.2$ and 10.3 Hz, 1H, H5), 3.11 (s, 3H, OCH₃), 2.17 (dd, $J = 5.1$ and 18.0 Hz, 1H, CHH-6), 1.98 (br s, 1H, OH), 1.47 (dd, $J = 10.3$ and 17.9

Hz, 1H, CHH-6), 0.80 (s, 3H, CH₃), 0.78 (s, 9H, CH₃) and 0.60 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 166.4 (C), 132.7 (C), 132.6 (CH), 109.7 (C), 81.9 (C), 78.2 (CH), 71.2 (CH), 52.3 (OCH₃), 30.6 (CH₂), 28.7 (CH₃), 26.9 (CH₃) and 16.6 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν: 2989 (OH) and 1709 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) *m/z* = 265 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₂H₁₈O₅Na (MNa⁺): 265.1046; found, 265.1048.

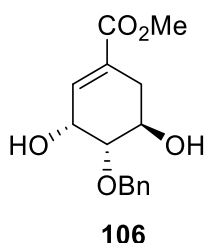
5.55 Methyl (3*R*,4*S*,5*R*)-4-benzyloxy-3,5-di(*tert*-butyldimethylsilyloxy)cyclohex-1-ene-1-carboxylate (**105**)



A solution of the alcohol **101**¹⁰² (106 mg, 0.25 mmol) in dry THF (0.8 mL), under argon and at 0 °C, was treated with NaH (15 mg, 0.38 mmol, *ca* 60% w/w in mineral oil) and stirred for 30 min. Benzyl bromide (40 μL, 0.38 mmol) was then added and the resulting suspension was stirred for 3 h. Saturated

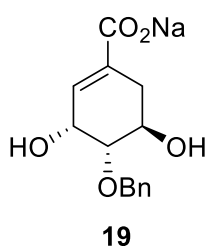
NH₄Cl was added and the organic solvent was removed under reduced pressure. The resulting aqueous solution was extracted with ethyl acetate (×3), dried (anh. Na₂SO₄), filtered and concentrated under reduced pressure. The crude obtained was purified by flash chromatography, eluting with (5:95) diethyl ether/hexane, to give the benzyl ether **105** (40 mg, 32%) as a colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = -86.5^\circ$ (c1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.34–7.26 (m, 5H, 5×ArH), 6.75 (m, 1H, H₂), 4.84 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, OCHHPh), 4.67 (m, 1H, H₃), 4.60 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, OCHHPh), 4.02 (m, 1H, H₅), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.49 (dt, *J* = 1.3 and 5.0 Hz, 1H, H₄), 2.64 (m, 1H, CHH-6), 2.18 (m, 1H, CHH-6), 0.95 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.82 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.12 (s, 3H, CH₃), 0.12 (s, 3H, CH₃), -0.03 (s, 3H, CH₃) and -0.06 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 167.4 (C), 139.6 (CH), 139.0 (C), 128.4 (2×CH), 128.1 (C), 127.9 (2×CH), 127.7 (CH), 78.2 (CH), 73.7 (CH₂), 68.0 (CH), 67.8 (CH), 51.8 (OCH₃), 30.3 (CH₂), 26.1 (C(CH₃)₃), 25.8 (C(CH₃)₃), 18.4 (C(CH₃)₃), 18.0 (C(CH₃)₃), -4.5 (CH₃), -4.6 (CH₃), -4.9 (CH₃) and -4.9 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν: 1720 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) *m/z* = 529 (MNa⁺). HRMS calcd for C₂₇H₄₆O₅Si₂Na (MNa⁺): 529.2776; found, 529.2776.

5.56 Methyl (3*R*,4*S*,5*R*)-4-benzyloxy-3,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylate (**106**)



A solution of silyl ether **105** (205 mg, 0.40 mmol) in dry THF (4 mL), at 0 °C and under inert atmosphere, was treated with TBAF (3 mL, 3.20 mmol, *ca* 1 M in THF). The resulting solution was stirred for 50 min and then diluted with ethyl acetate and water. The aqueous layer was separated and the organic layer was washed with saturated NaHCO₃. The aqueous layer was acidified with HCl (10%) and extracted with ethyl acetate (×3). The combined organic extracts were dried (anh. Na₂SO₄), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with (60:40) ethyl acetate/hexane, to give the diol **106** (84 mg, 76%) as a white solid. Mp: 194–195 °C. $[\alpha]_D^{20} = -23.3^\circ$ (c0.6, (CH₃)₂CO). ¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 7.44–7.30 (m, 5H, 5×ArH), 6.79 (br s, 1H, H₂), 4.80 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, OCHHPh), 4.72 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, OCHHPh), 4.57 (br s, 1H, OH), 4.25 (m, 1H, OH), 4.11 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H₃), 3.90 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H₅), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.67 (dd, *J* = 4.1 and 6.1 Hz, 1H, H₄), 2.66 (dt, *J* = 2.1 and 18.0 Hz, 1H, CHH-6) and 2.27 (m, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 166.6 (C), 139.9 (CH), 139.2 (C), 128.1 (2×CH), 127.4 (2×CH), 127.3 (C), 127.2 (CH), 78.2 (CH), 71.9 (CH₂), 64.9 (2×CH), 51.6 (OCH₃) and 30.1 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3348 (OH) and 1718 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) *m/z* = 301 (MNa⁺). HRMS calcd for C₁₅H₁₈O₅Na (MNa⁺): 301.1046; found, 301.1046.

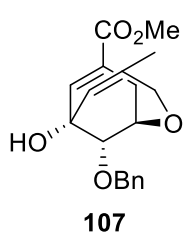
5.57 (3*R*,4*S*,5*R*)-4-benzyloxy-3,5-dihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylic (**19**)



It was prepared following the general basic hydrolysis procedure for the synthesis of carboxylic acids as sodium salts using methyl ester **106** (53 mg, 0.19 mmol), aqueous solution of NaOH (0.2 mL, 0.19 mmol, 1 M), THF (1.7 mL). Reaction time = 12 h. Yield = 84% (42 mg). White solid. Mp: 195–197 °C. $[\alpha]_D^{20} = -118.6^\circ$ (c1.0,

CH₃OH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.38–7.20 (m, 5H, 5×ArH), 6.77 (br s, 1H, H₂), 4.73 (d, J = 11.9 Hz, 1H, OCHHPH), 4.62 (d, J = 11.9 Hz, 1H, OCHHPH), 4.45 (br s, 1H, H₃), 4.06 (m, 1H, H₅), 3.52 (m, 1H, H₄), 2.65 (m, 1H, CHH-6) and 2.17 (dd, J = 4.9 and 18.2 Hz, 1H, CHH-6) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 170.0 (C), 140.0 (C), 139.0 (CH), 130.7 (C), 129.3 (2×CH), 129.1 (2×CH), 128.7 (CH), 80.2 (CH), 73.7 (CH₂), 66.9 (CH), 66.3 (CH) and 31.7 (CH₂) ppm. FTIR (ATR) ν : 3349 (OH) and 1681 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 263 (M-H). HRMS calcd for C₁₄H₁₅O₅ (M-H): 263.0925; found, 263.0926.

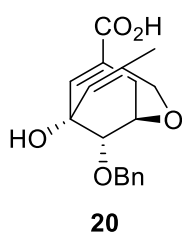
5.58 Methyl (1*R*,6*S*,10*S*)-6-benzyloxy-10-hydroxy-4-methyl-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4,7-diene-8-carboxylate (**107**)



A solution of the alcohol **41a**⁶⁰ (137 mg, 0.57 mmol) in dry THF (1.9 mL), at 0 °C and under argon, was treated with NaH (34 mg, 0.86 mmol, *ca* 60% w/w in mineral oil). After 30 min stirring, benzyl bromide (100 μ L, 0.86 mmol) was added, the ice bath was removed and the reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature. Saturated NH₄Cl was added and the tetrahydrofuran was removed under reduced pressure. The aqueous solution was extracted with ethyl acetate ($\times 3$). The combined organic extracts were dried (anh. Na₂SO₄), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography, eluting with (50:50) ethyl acetate/hexane, to give the compound **107** (49 mg, 26%) as a yellow oil. It was also recovered 21 mg of starting material. Corrected yield = 41%. $[\alpha]_D^{20}$ = -55.0° (c 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.38–7.30 (m, 5H, 5×ArH), 6.73 (m, 1H, H₇), 5.57 (m, 1H, H₅), 4.68 (d, J = 16.4 Hz, 1H, OCHHPH), 4.68 (s, 1H, OCHHPH), 4.31 (q, J = 2.7 Hz, 1H, H₁), 4.11 (m, 1H, OCHH-3), 3.96 (m, 1H, H₁₀), 3.90 (d, J = 16.4 Hz, 1H, OCHH-3), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.04 (s, 1H, OH), 2.60 (dt, J = 2.9 and 18.1 Hz, 1H, CHH-9), 2.44 (m, 1H, CHH-9) and 1.69 (m, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.5 (C), 139.7 (CH), 139.1 (C), 137.3 (C), 128.8 (2×CH), 128.4 (CH), 128.1 (2×CH), 127.3 (CH), 127.0 (C), 77.9 (CH), 74.3 (CH₂), 71.6 (CH), 71.4 (C), 67.0

(CH₂), 51.9 (CH₃), 27.7 (CH₂) and 22.1 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3484 (OH) and 1709 (CO) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 353 (MH⁺). HRMS calcd for C₁₉H₂₂O₅Na (MH⁺): 353.1359; found, 353.1359.

5.59 (1*R*,6*S*,10*S*)-6-benzyloxy-10-hydroxy-4-methyl-2-oxabicyclo[4.3.1]deca-4,7-diene-8-carboxylic acid (20)



It was prepared following the general basic hydrolysis procedure describe for synthesis of compounds **10** using the ester **107** (65 mg, 0.20 mmol), LiOH (0.8 mL, 1.00 mmol, 2.5 M), THF (2 mL). Reaction time = 7 h. Yield = 90% (57 mg). White solid. Mp: 100–102 °C. $[\alpha]_D^{20}$ = -184.0° (c0.9, CH₃OH). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ : 7.40–7.28 (m, 5H, 5×ArH), 6.65 (br s, 1H, H7), 5.50 (m, 1H, H5), 4.82 (d, J = 11.9 Hz, 1H, OCHHPh), 4.65 (d, J = 11.9 Hz, 1H, OCHHPh), 4.22 (m, 1H, H1), 4.15 (d, J = 16.5 Hz, 1H, OCHH-3), 3.97 (d, J = 4.0 Hz, 1H, H10), 3.83 (d, J = 16.5 Hz, 1H, OCHH-3), 2.61 (dt, J = 2.7 and 18.0 Hz, 1H, CHH-9), 2.30 (m, 1H, CHH-9) and 1.69 (s, 3H, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ : 171.6 (C), 140.1 (CH), 140.0 (C), 139.7 (C), 129.5 (2×CH), 129.4 (CH), 129.3 (C), 129.2 (2×CH), 128.9 (CH), 78.8 (CH), 75.3 (CH₂), 73.6 (CH), 73.1 (C), 67.5 (CH₂), 28.8 (CH₂) and 22.2 (CH₃) ppm. FTIR (ATR) ν : 3410 (OH) cm⁻¹. MS (ESI) m/z = 315 (M-H). HRMS calcd for C₁₈H₁₉O₅ (M-H): 315.1238; found, 315.1238.





Capítulo 6. Conclusiones



1. Diverse rigidified shikimic acids derivatives, which are stable mimetics of the high-energy conformation of shikimic acid, compounds **10**, have been synthesized to enhance inhibitor efficacy against shikimate kinase enzyme, a recognized attractive target for antibiotic drug discovery. The key step of the synthesis of compounds **10** was the ring-closing metathesis of allyloxy vinyl derivatives **22**, which were obtained by Trost allylation of previously reported alcohol **23** with allyl methyl carbonates **24**. Compounds **10** proved to be reversible competitive inhibitors of shikimate kinase from *H. pylori* and *M. tuberculosis*, showing inhibition constants values in the low micromolar range. In general, the ligands revealed to be more potent against the *H. pylori* enzyme than the *M. tuberculosis* one. The most potent inhibitor against shikimate kinase from *H. pylori* was compound **10f**, which incorporate a CH₂OEt group in the ether bridge, having a K_i value of 5 μ M that represents a 20-fold enhancement in the inhibitory potency relative to the parent compound **21**. For the *M. tuberculosis* enzyme, the introduction of a methyl group in **21**, compound **10a** (K_i = 28 μ M), enhanced the ligand potency by a factor of two.
2. Molecular Dynamic simulation studies carried out with the enzyme/ATP/ligand complexes revealed that the differences in affinity found with the two homologous enzymes are due to the distinct induced-fit conformation adopted by the two enzymes upon ligand binding, which mainly involves the substrate-covering loop (LID). For the *H. pylori* enzyme, the substituents (R = Et, *n*Pr, *n*Bu, CH₂OEt) would be embedded in the active site, with both the LID and the SB domain completely surrounding the entire ligand. As a result, the active site would be neatly closed because the ligands cause a dramatic reduction in the flexibility of the lid and SB domain through a series of favorable apolar interactions between the substituent and the residues in this pocket. In contrast, for the *H. pylori* enzyme, as the length of the substituent increases this moiety of the ligand would be pointing away

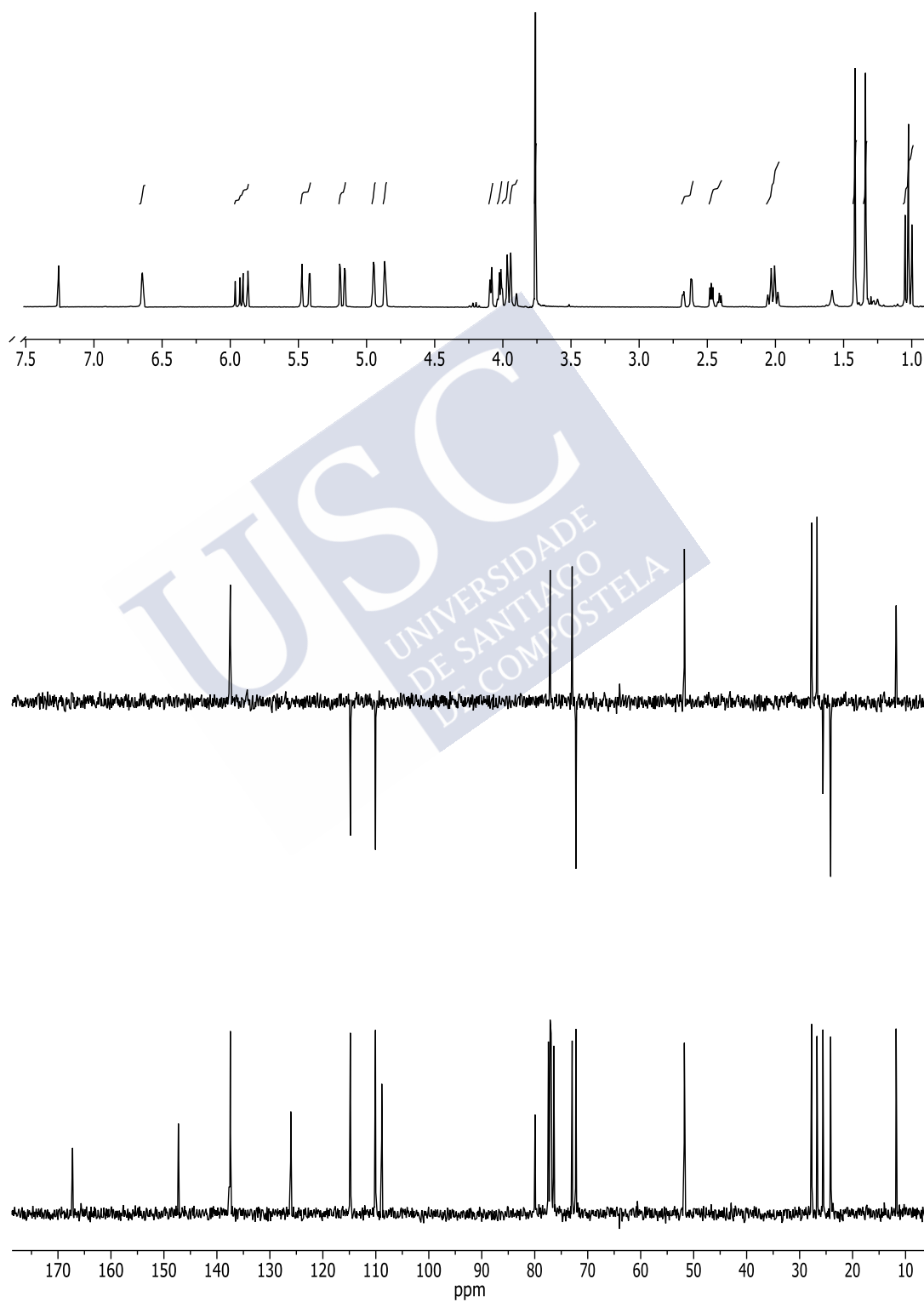
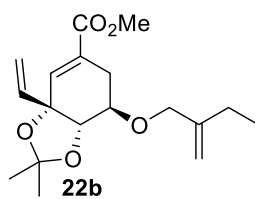
from the active site and therefore they would not contribute to an improvement in ligand affinity.

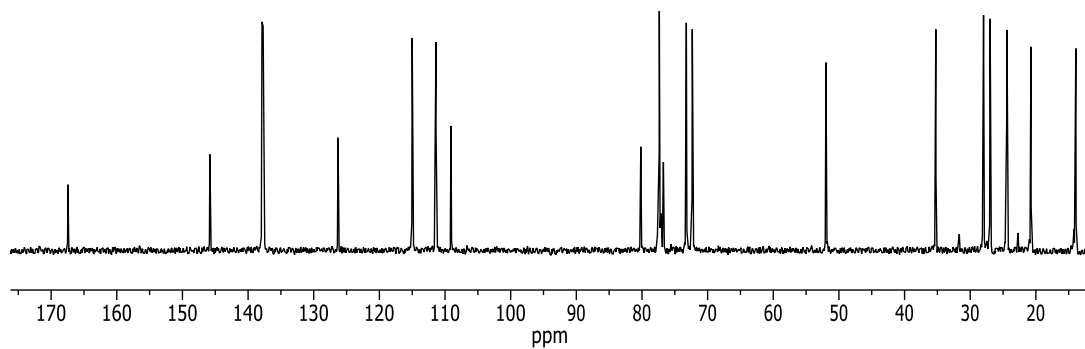
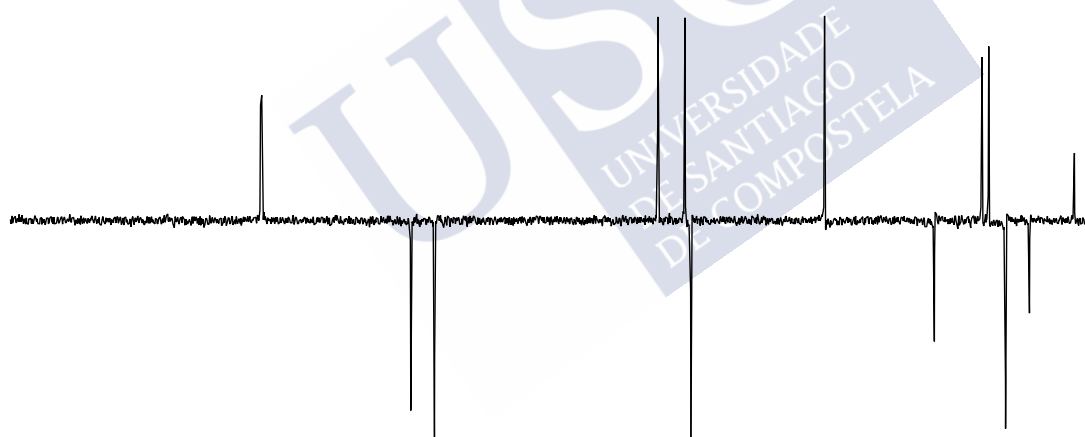
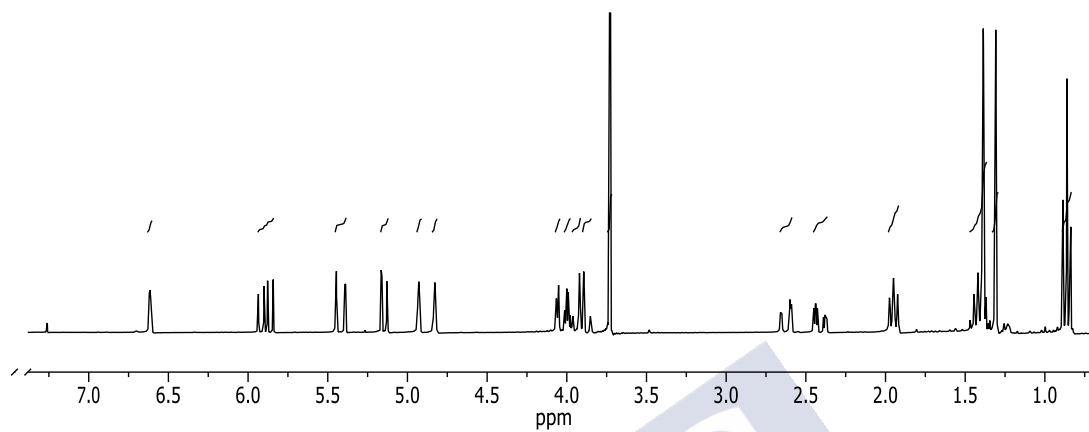
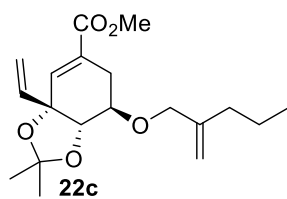
3. The studies carried out to explore the inhibition of the shikimate kinase by ligands **14–17**, which were designed to block the closure of the active site by reducing the flexibility of the LID and SB domains, resulted in a weak inhibition of the enzyme. The synthesis of analogues **14–15** and **17** was carried out by the reductive amination of previously reported amines **79**, **80** and **96** and the appropriate aldehydes **81**, **85** and **96**. The triazoles **16** were synthesized in four steps from protected shikimic acid **88** and *via* a 1,3-dipolar cycloaddition as the key step.
4. Compounds **18–19** were synthesized to explore if the functionalization of the C4 position of the natural substrate would allow the ligand to more adequately occupy the dynamic gap available in the *M. tuberculosis* enzyme. The synthesis of these compounds was achieved in four, three and two steps from the known alcohol **101** and the bicycle **41a**, respectively. The enzymatic evaluation of these compounds revealed that these modifications do not provide ligands with improved inhibitory properties.

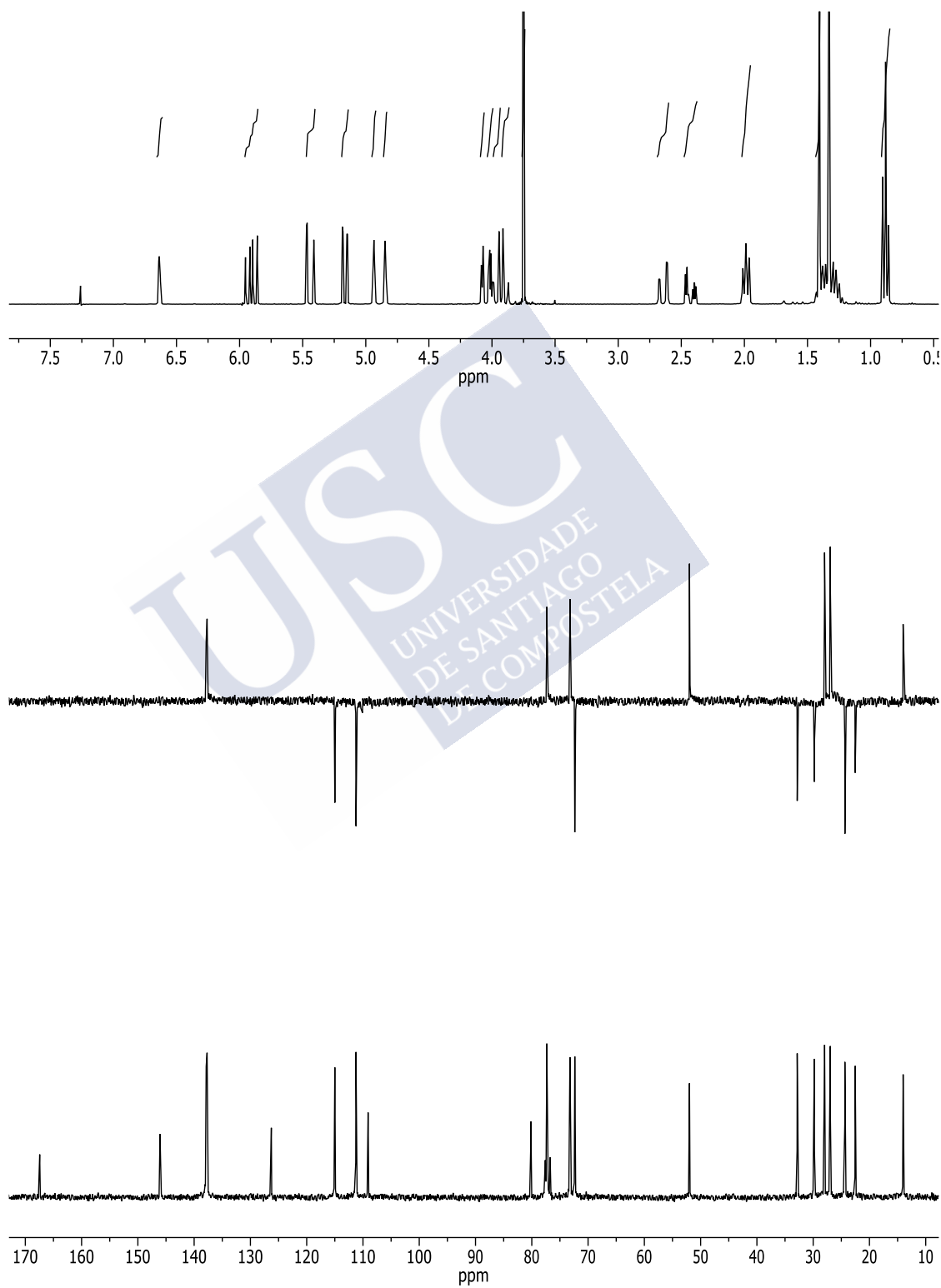
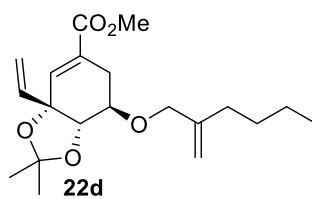


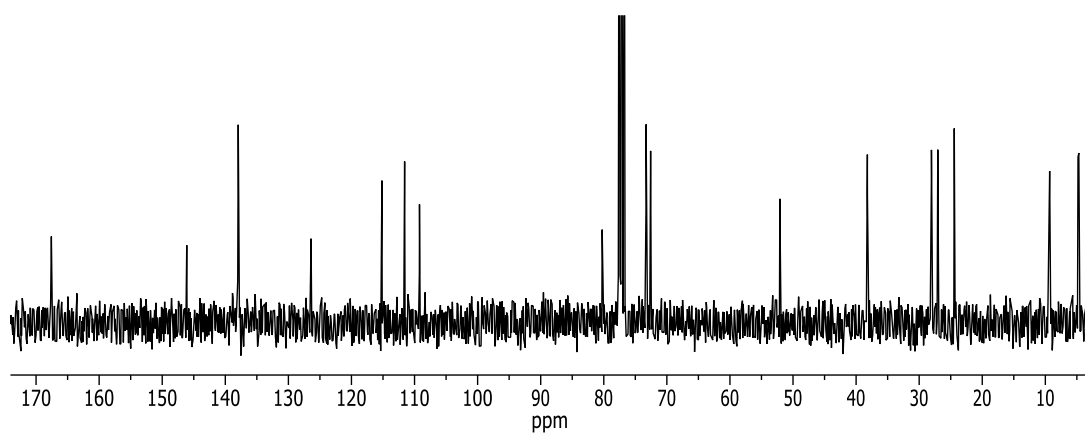
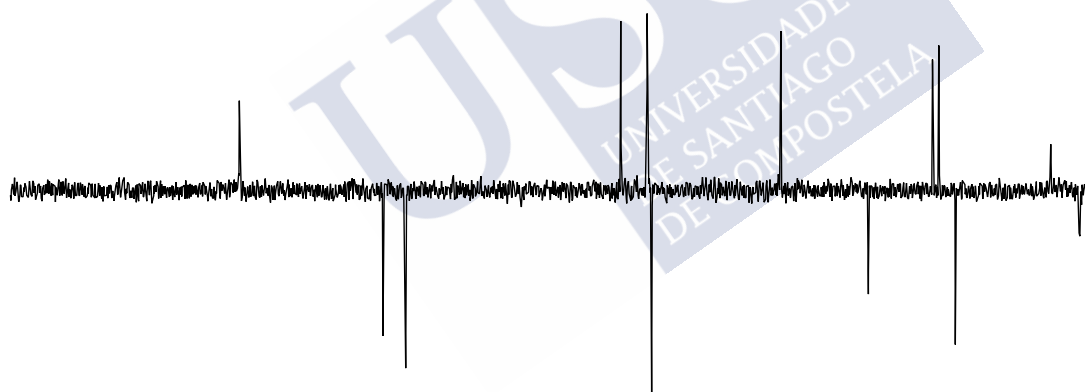
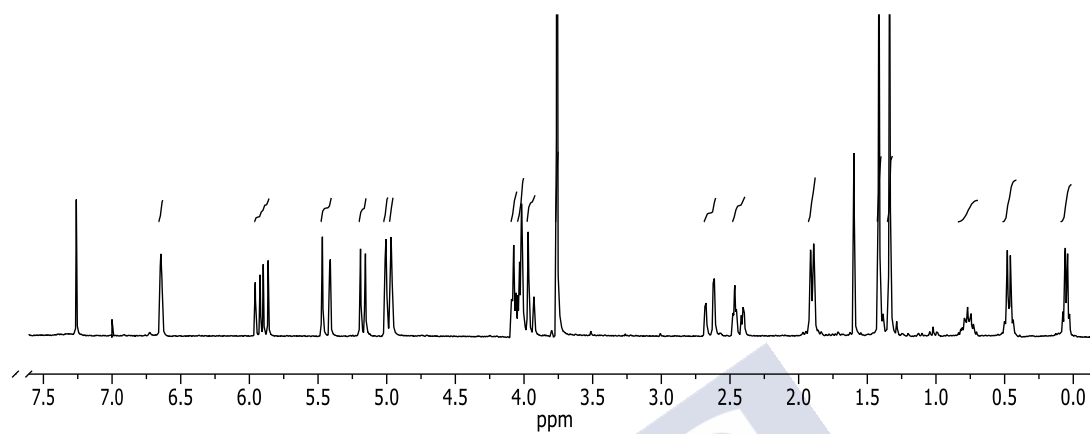
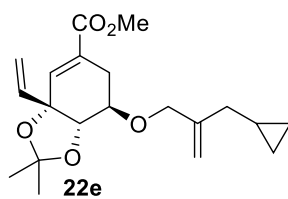
ANEXO I: Espectros de RMN

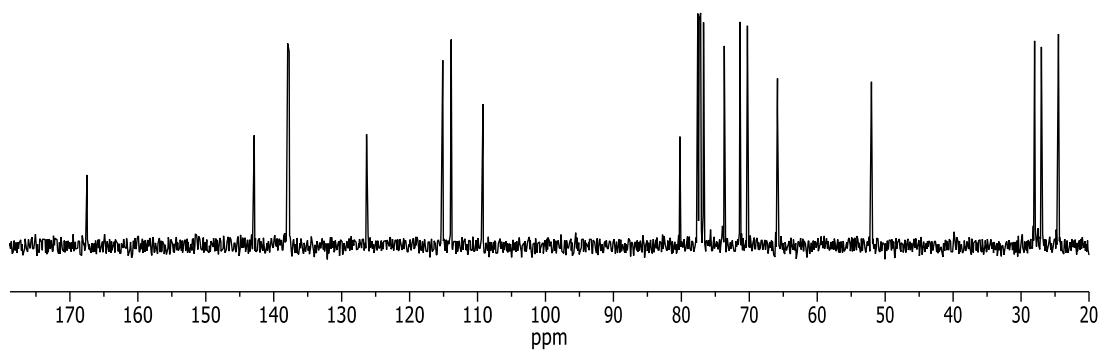
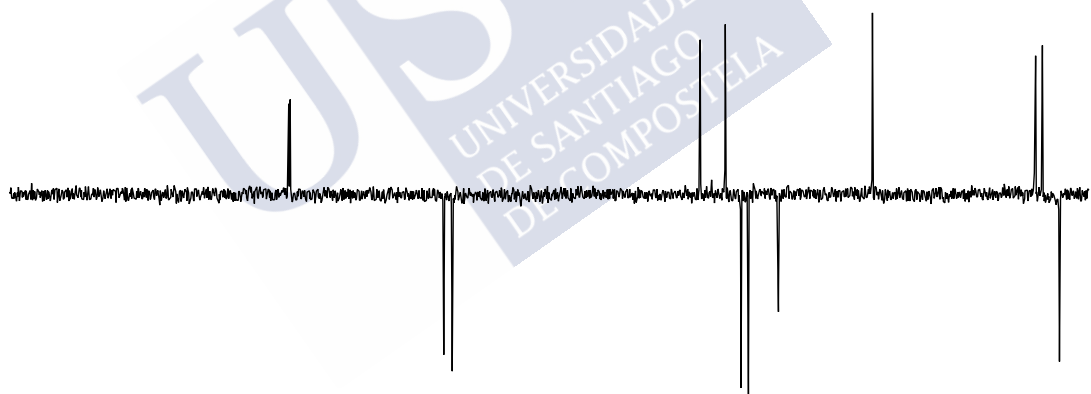
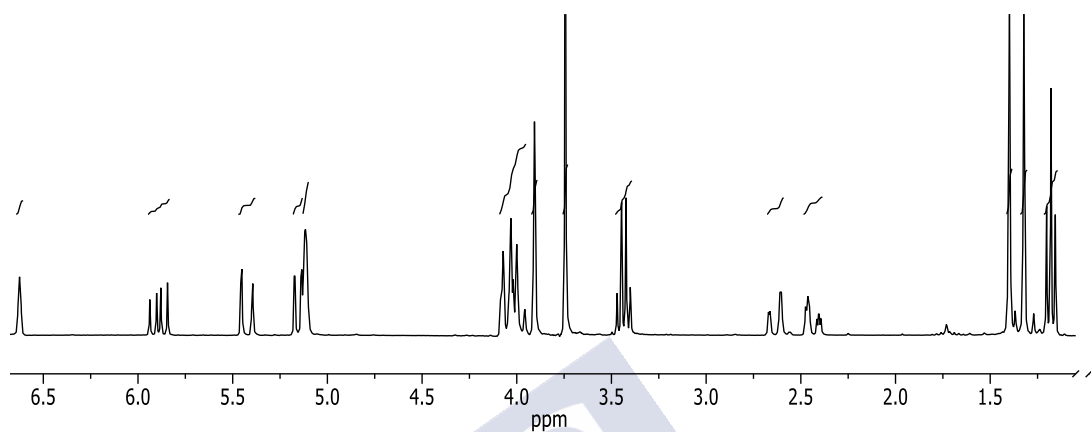
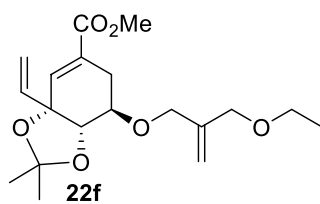


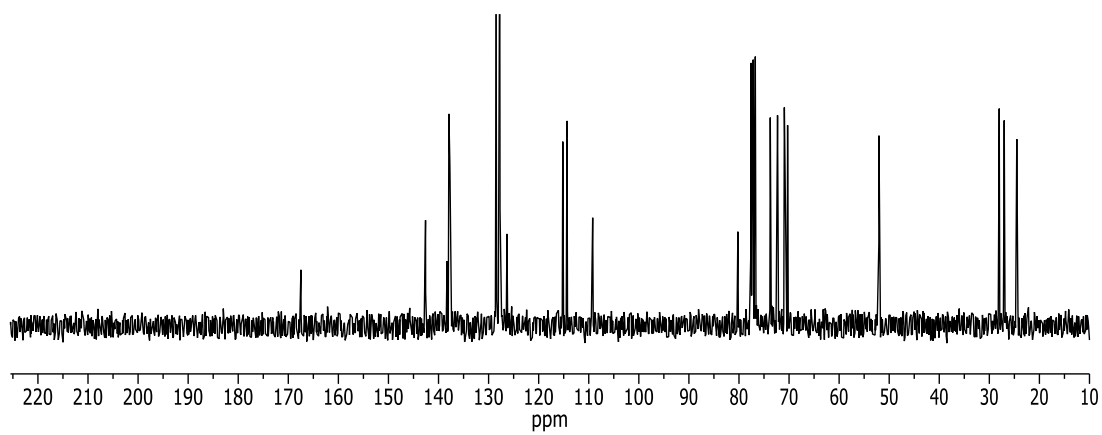
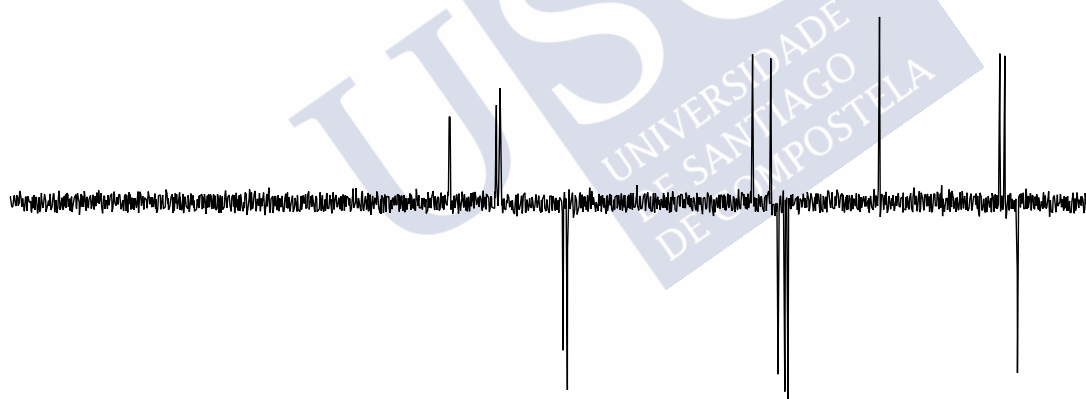
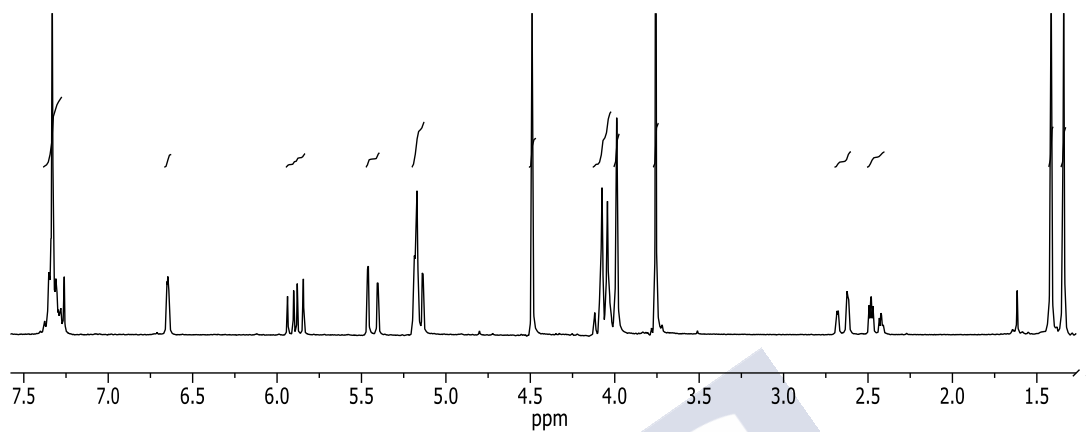
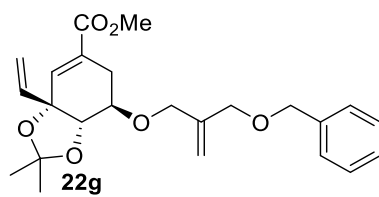


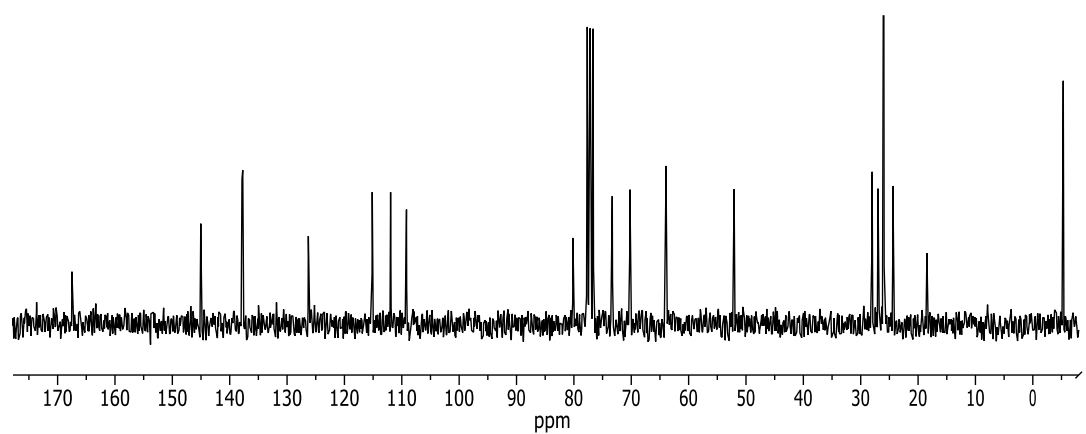
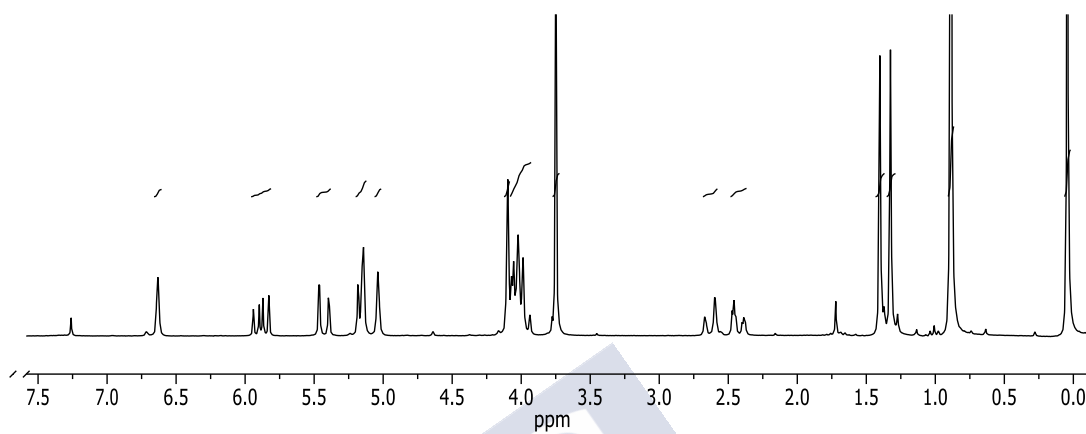
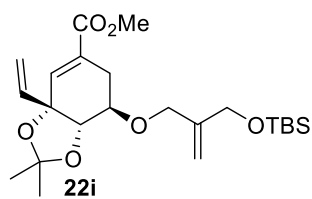


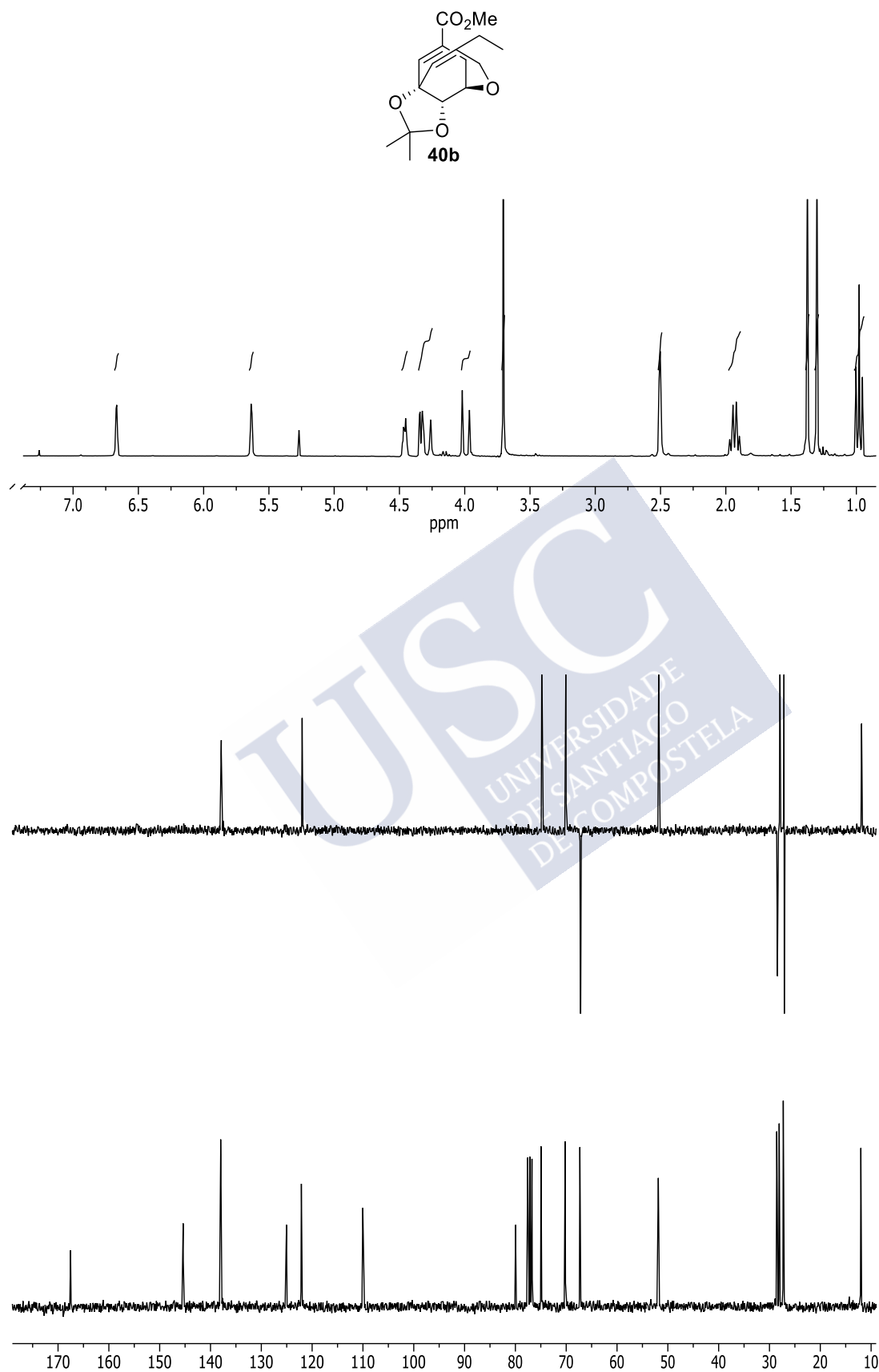


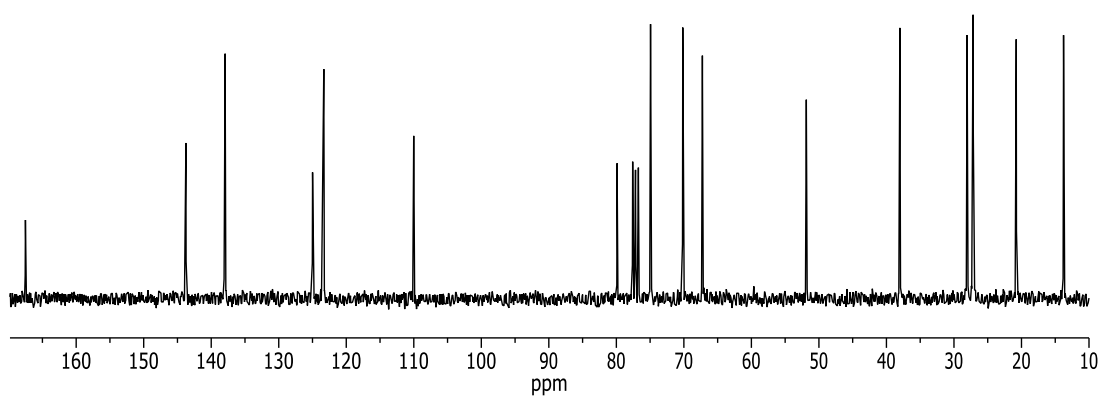
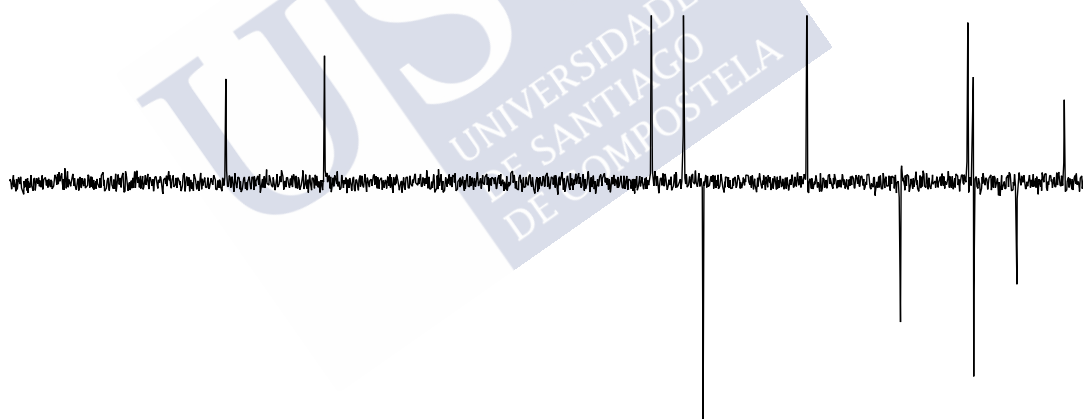
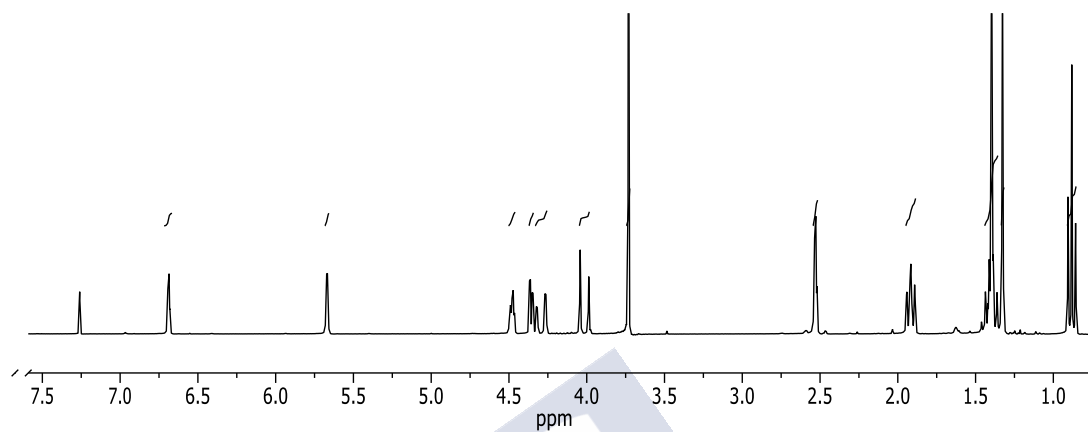
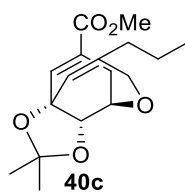


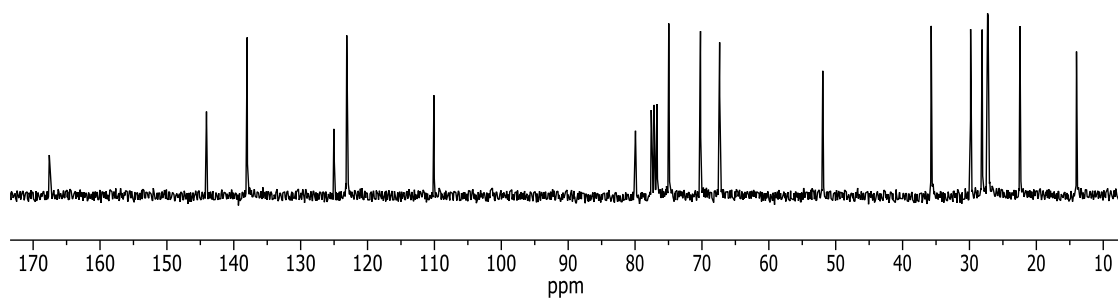
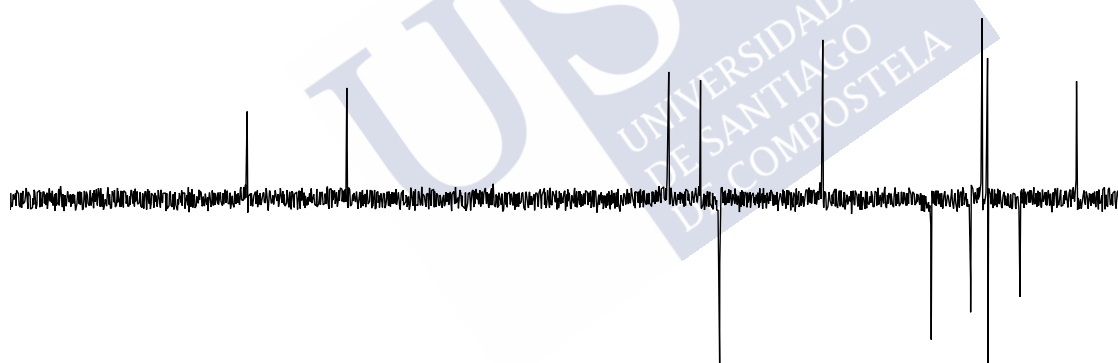
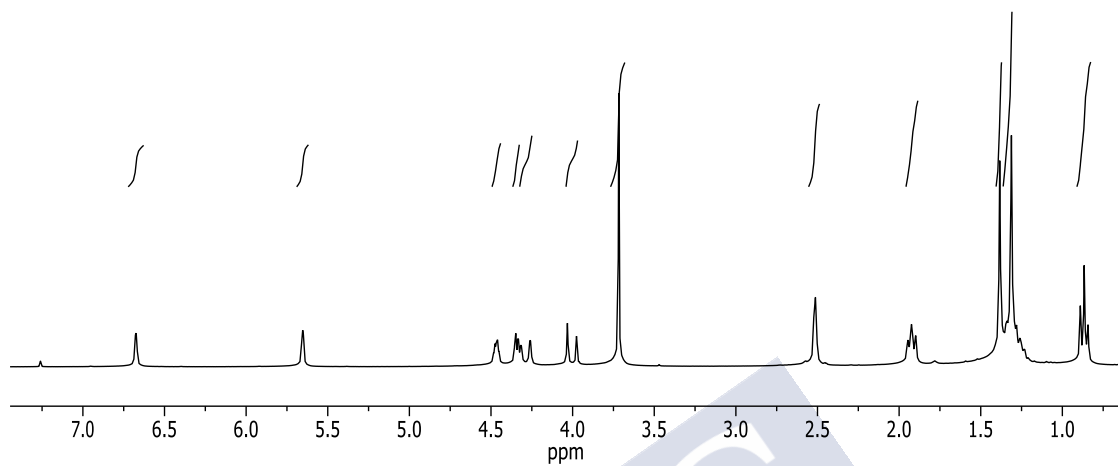
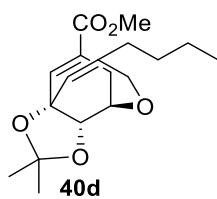


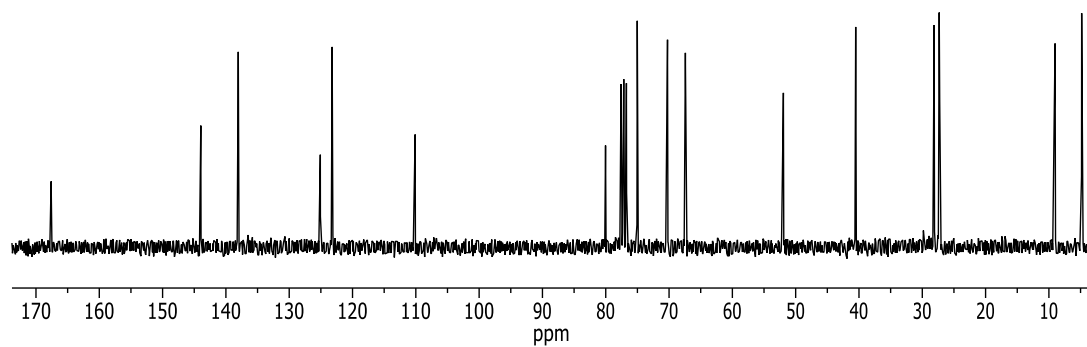
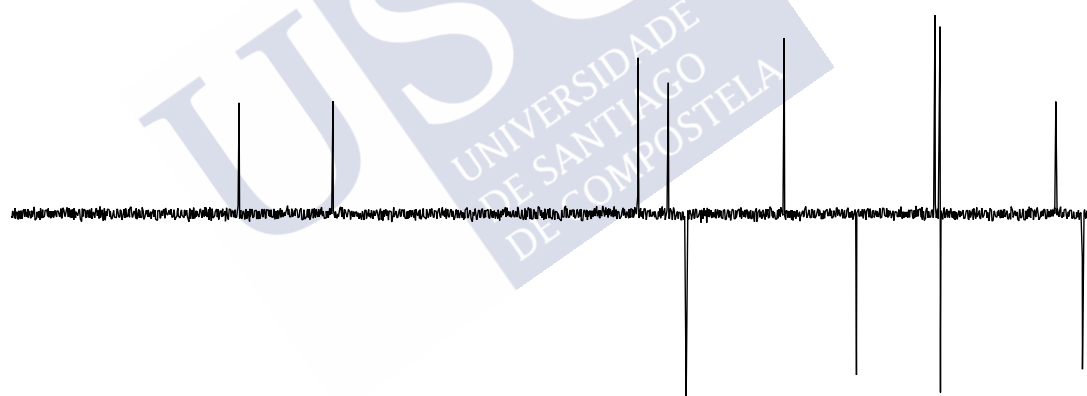
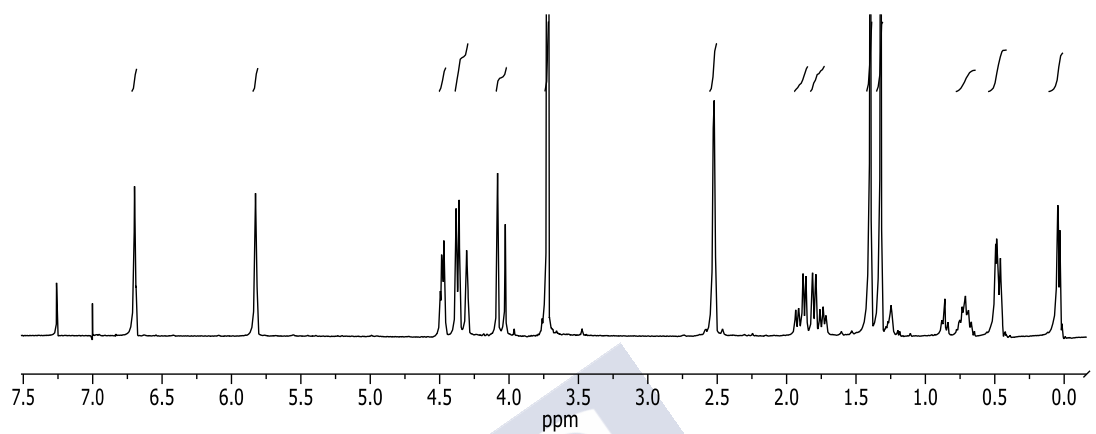
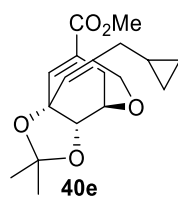


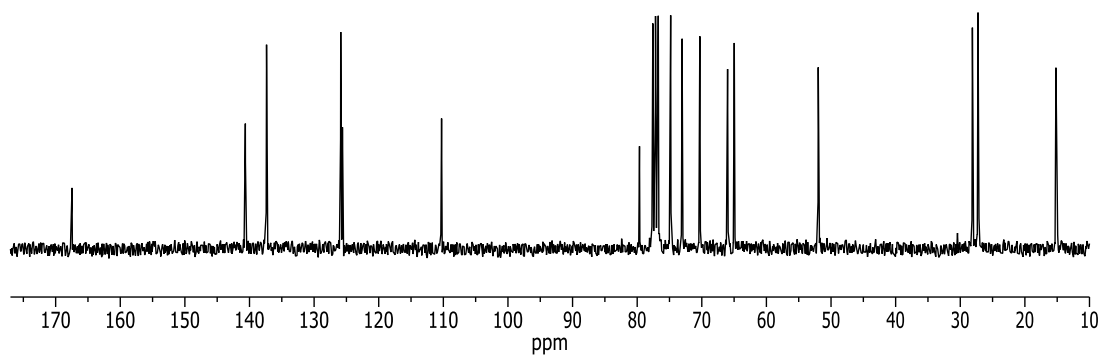
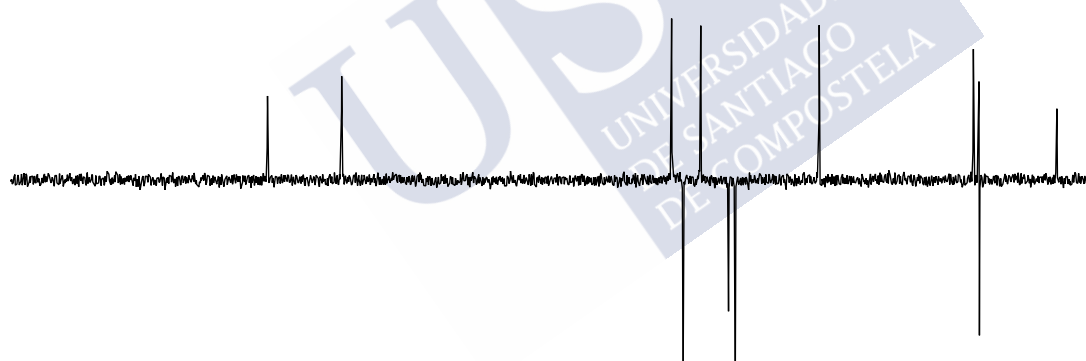
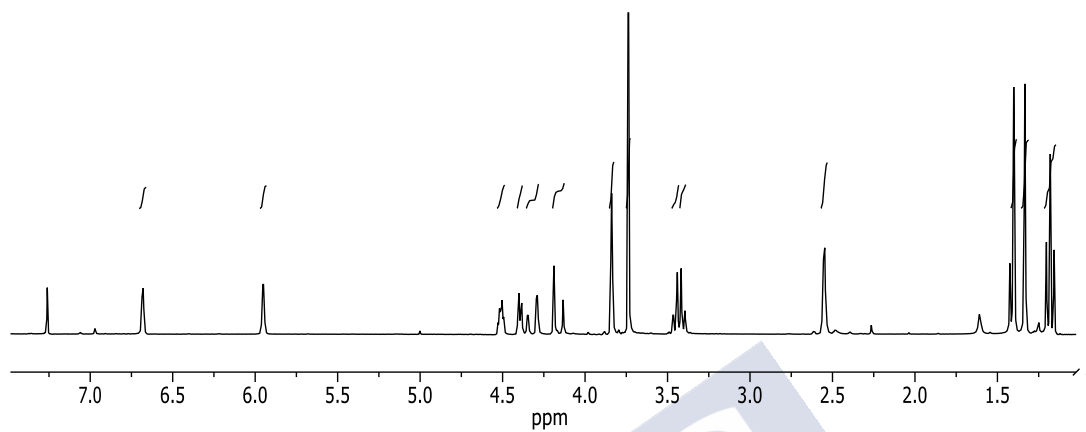
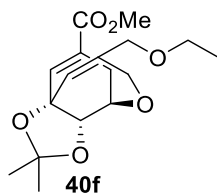


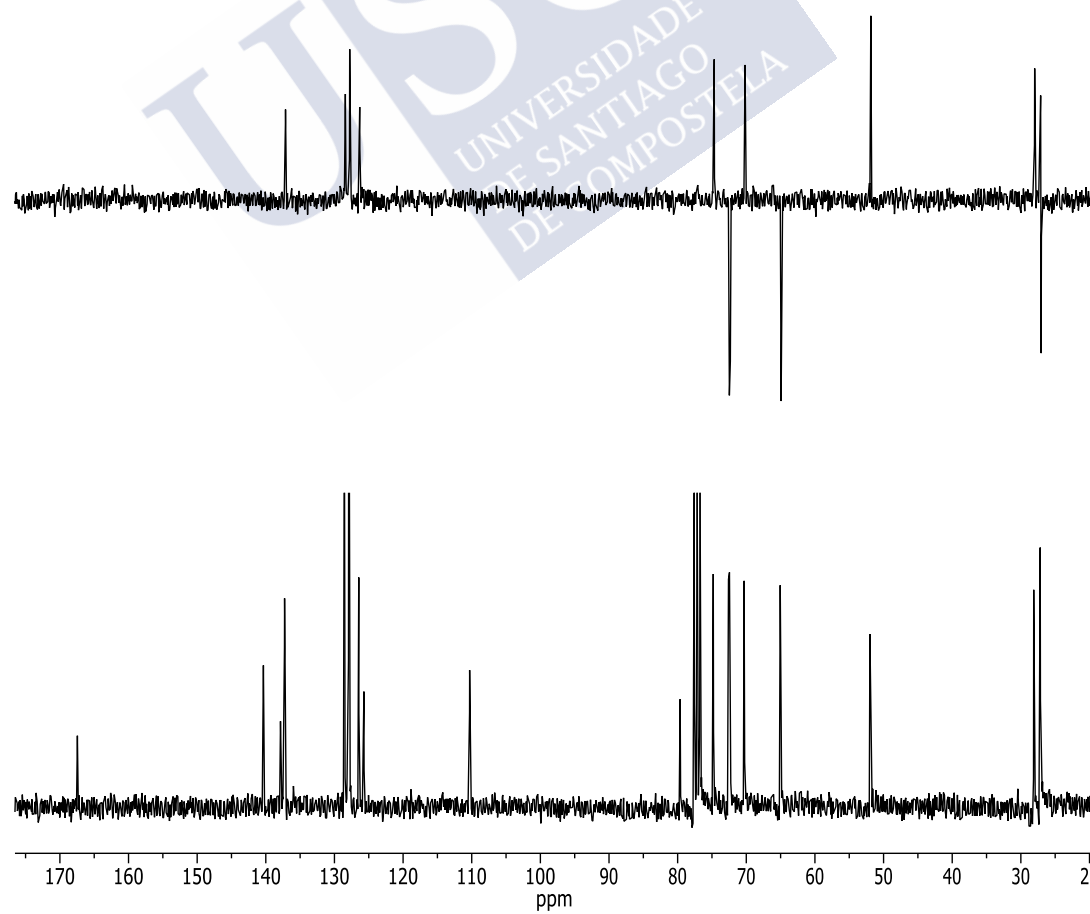
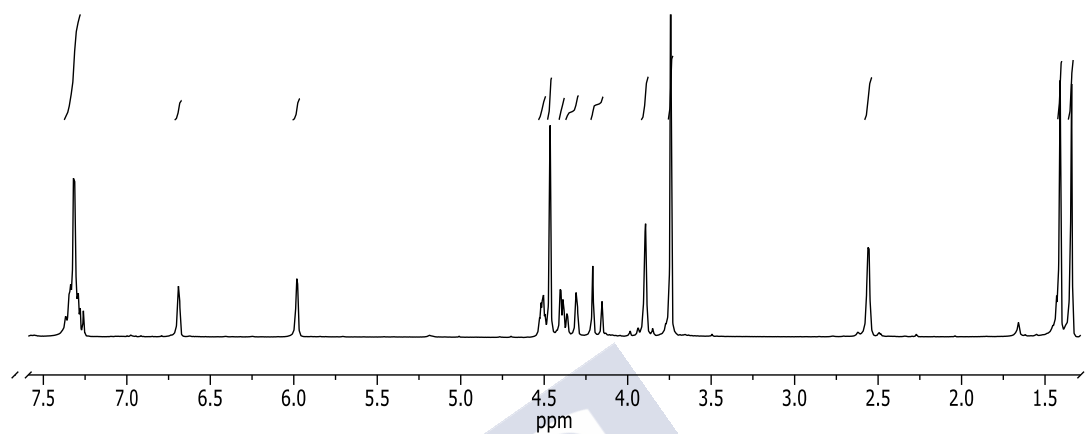
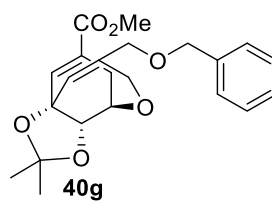


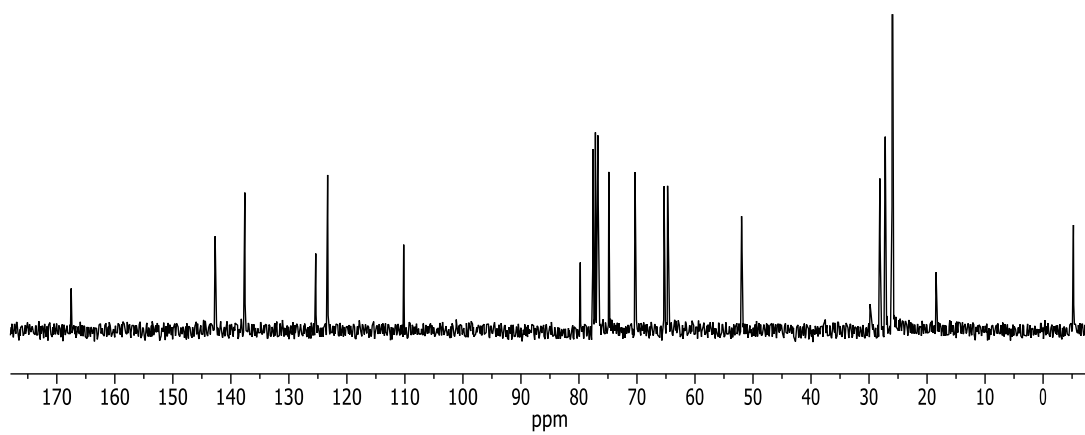
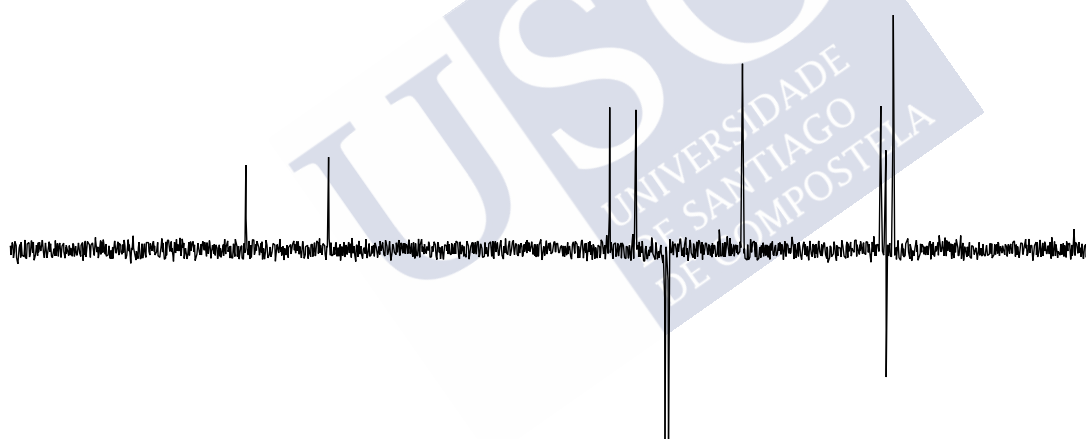
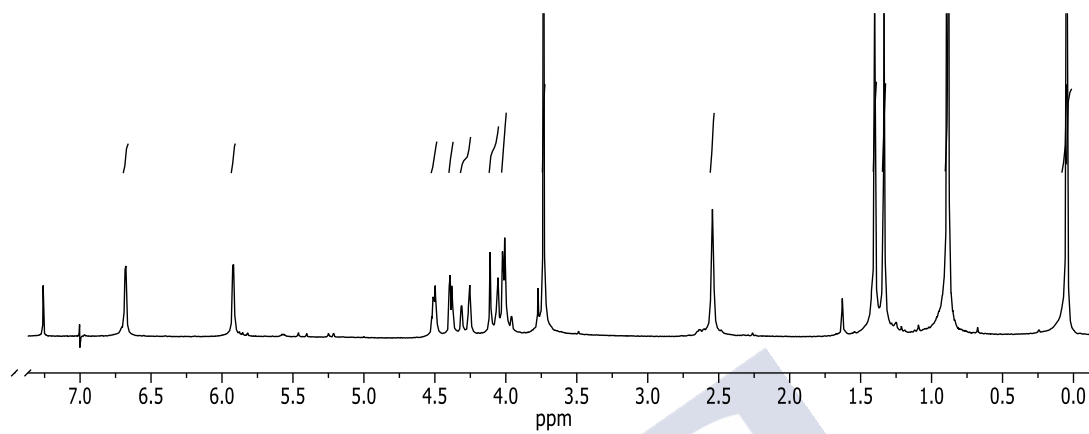
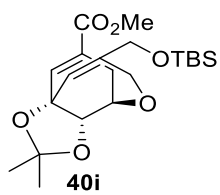


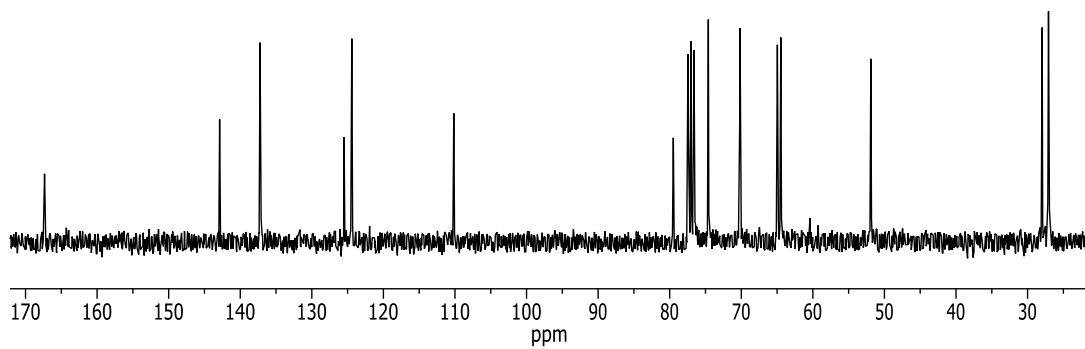
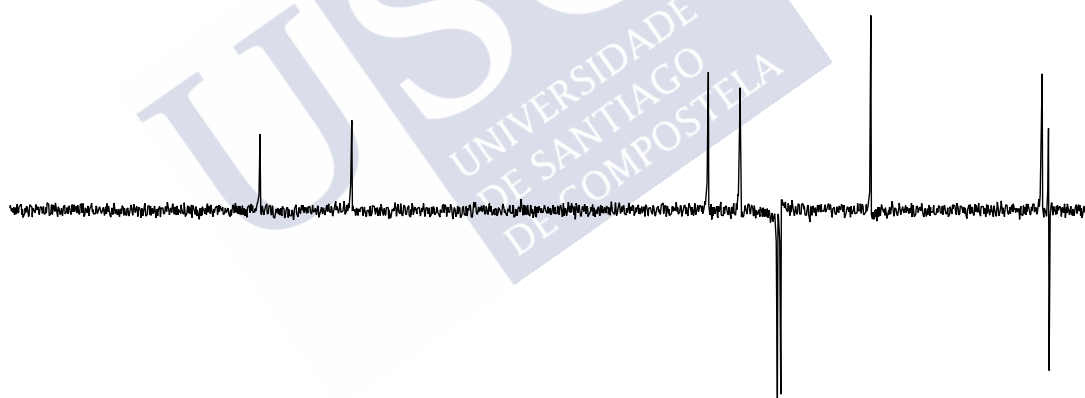
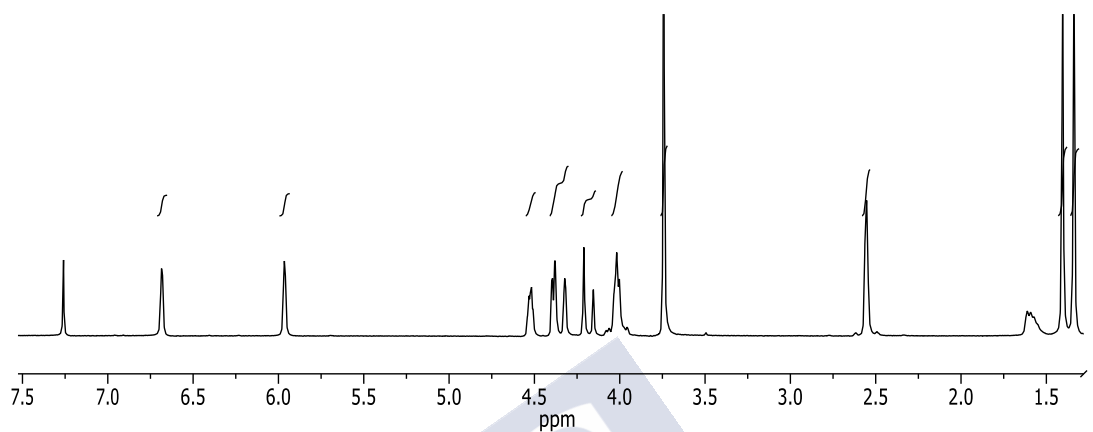
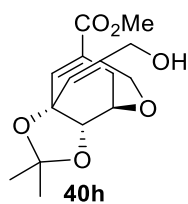


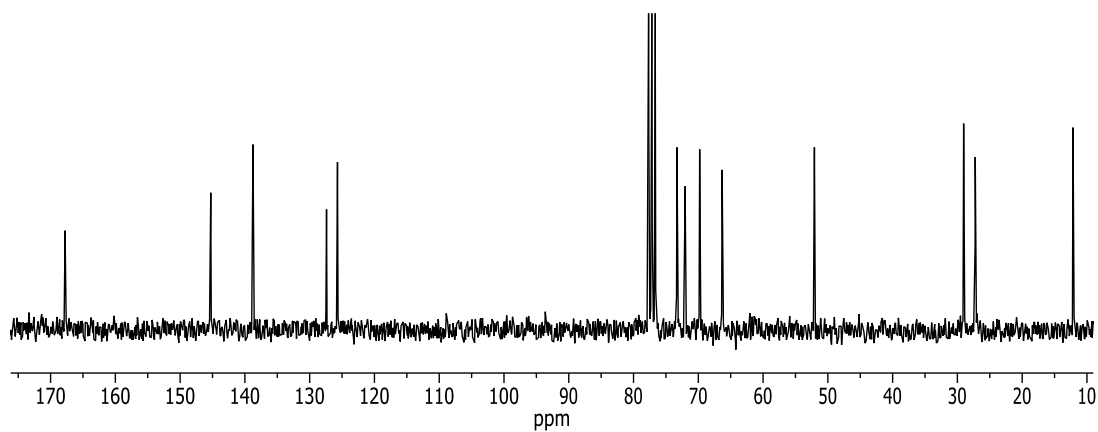
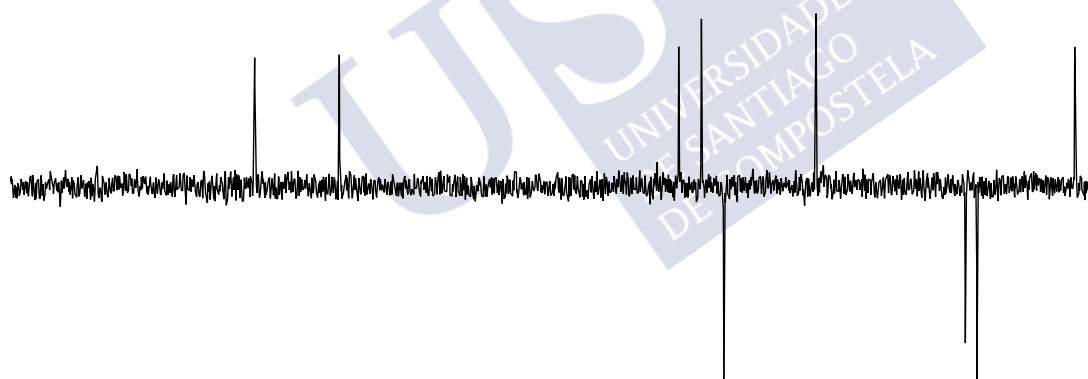
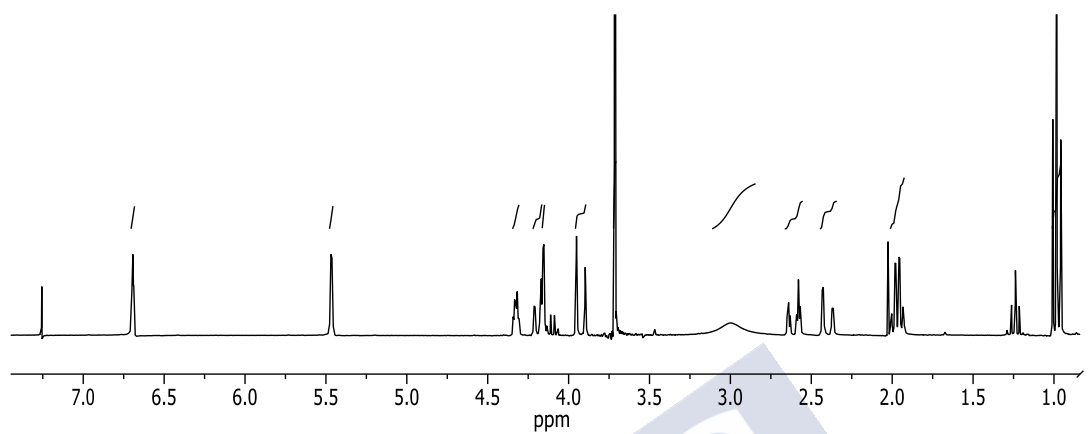
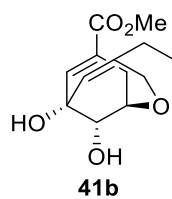


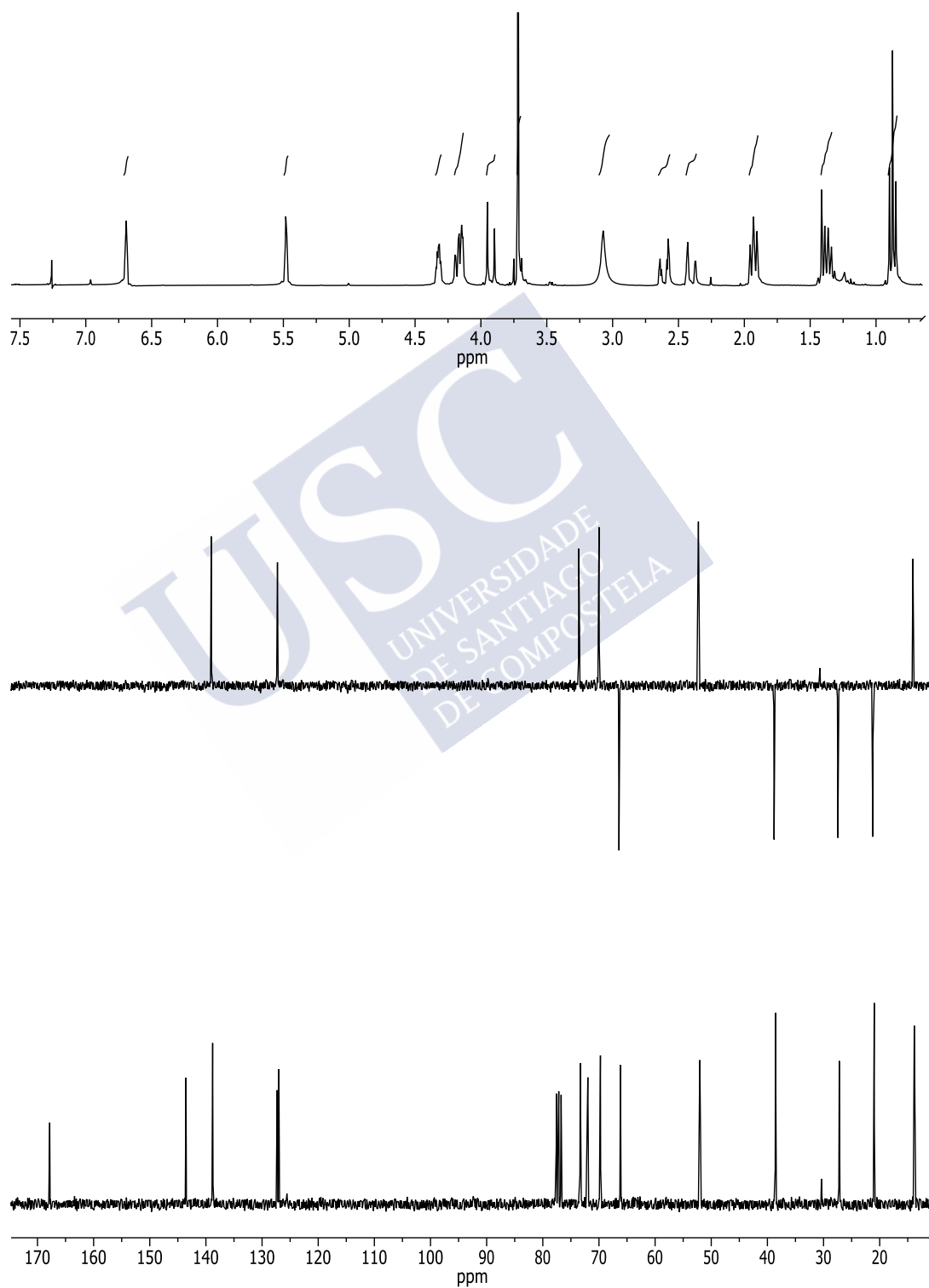
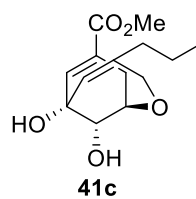


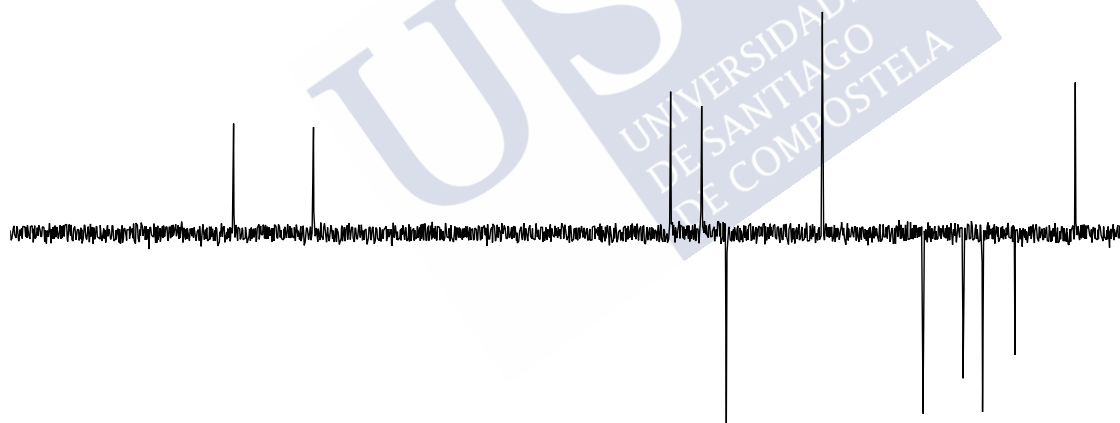
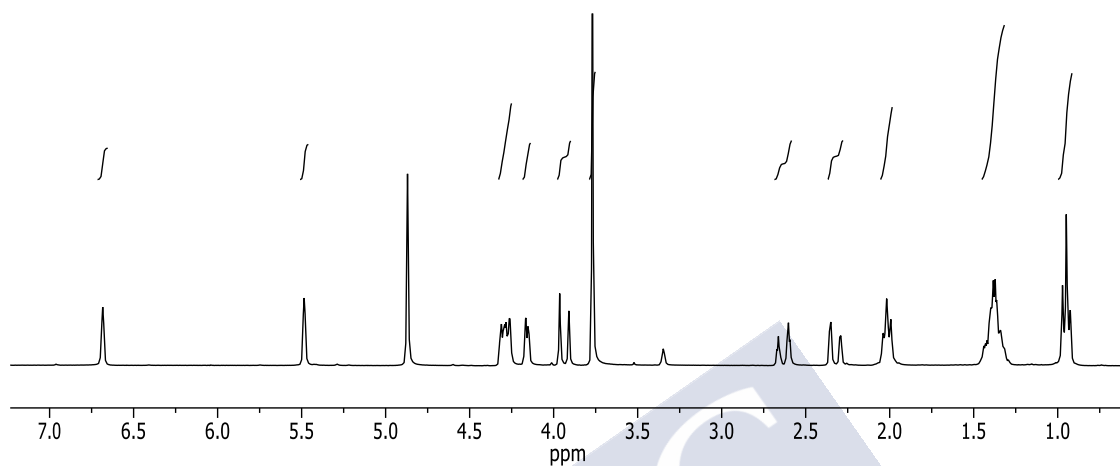
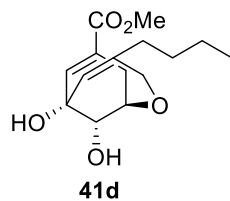


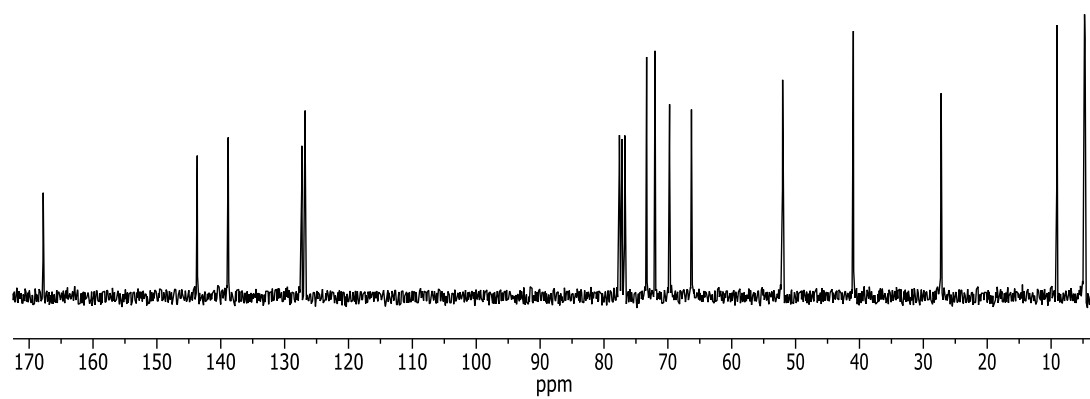
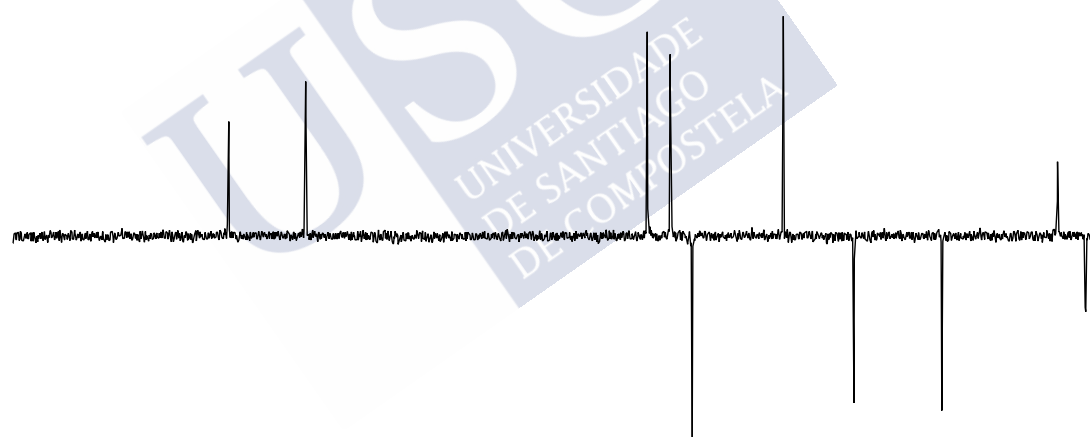
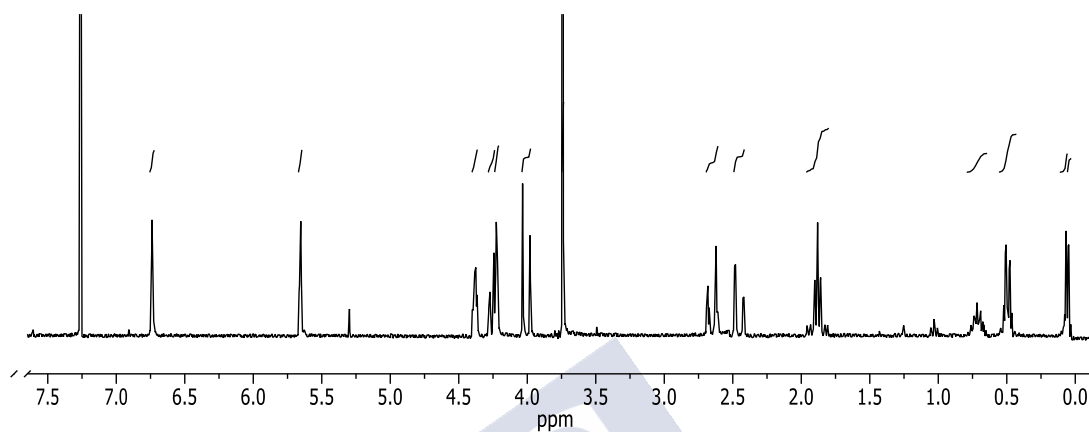
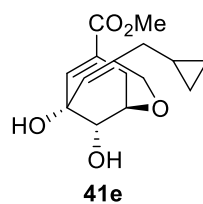


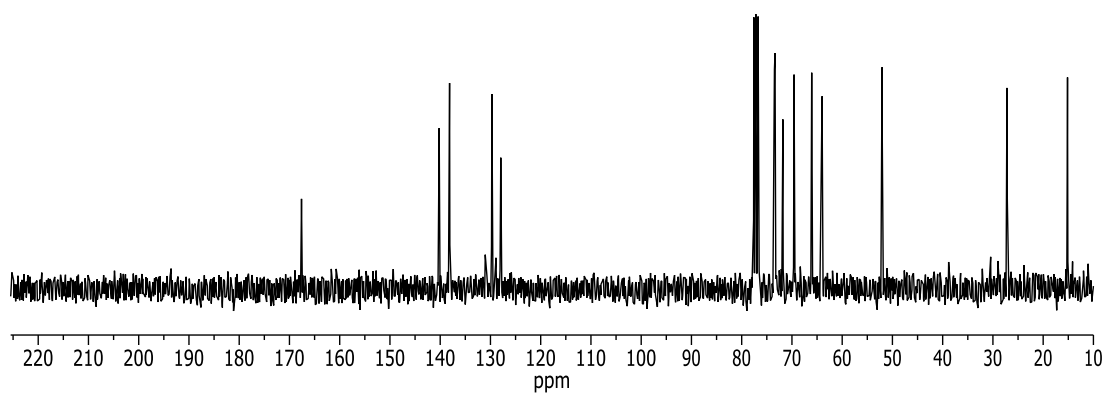
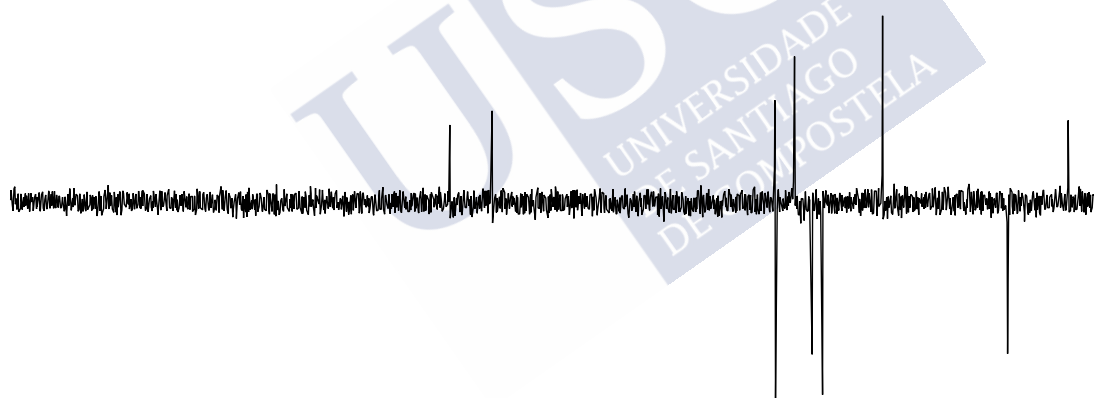
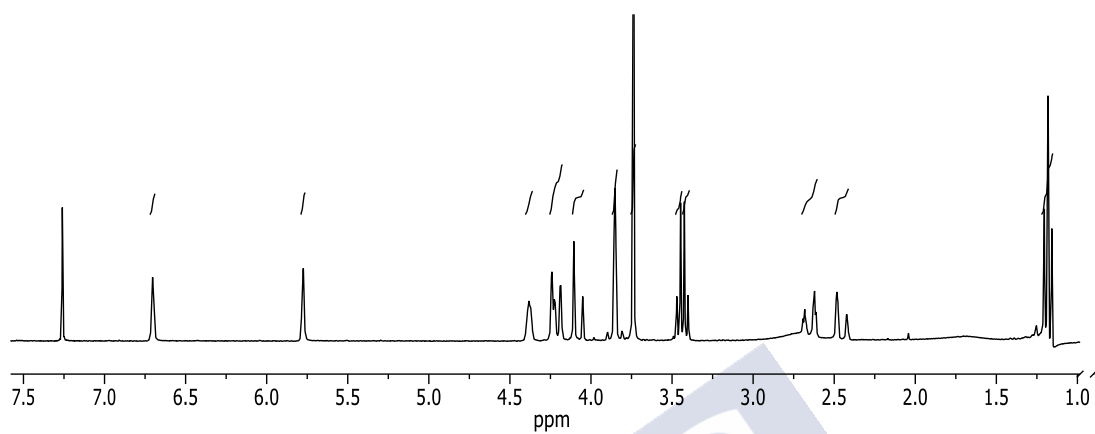
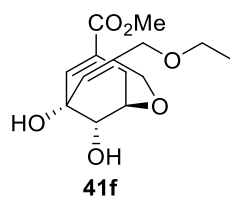


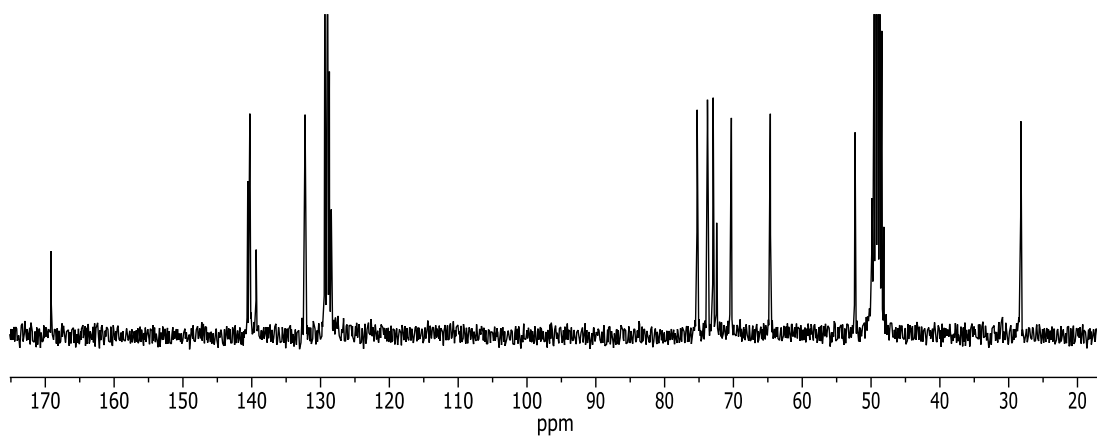
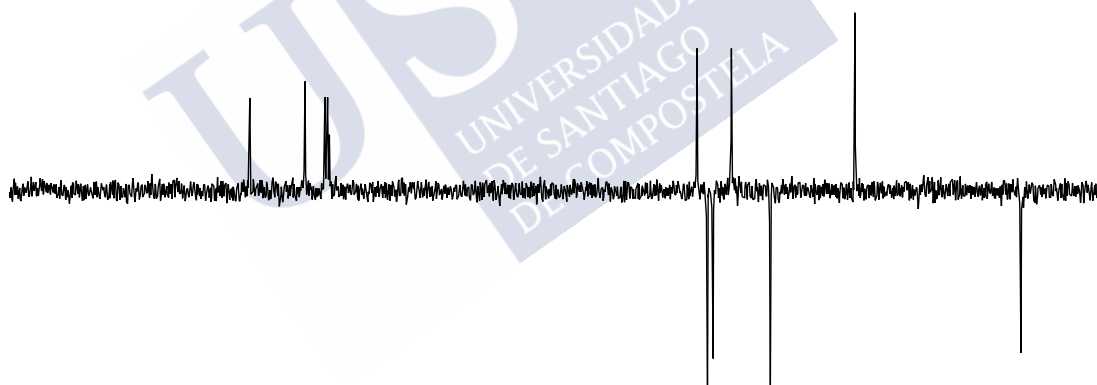
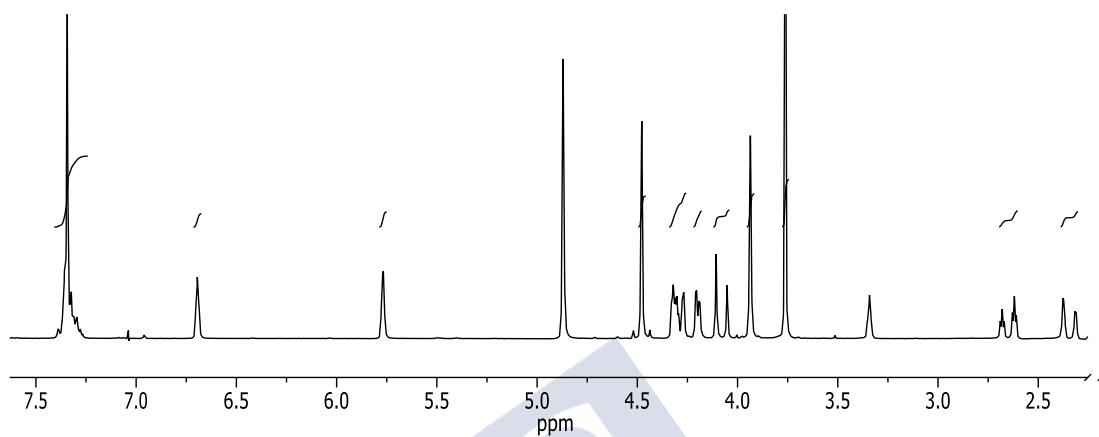
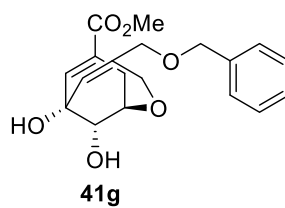


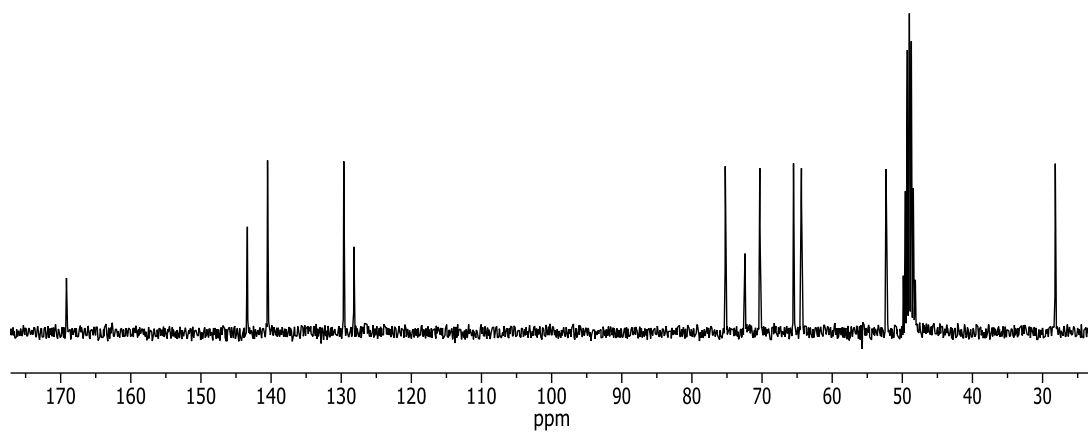
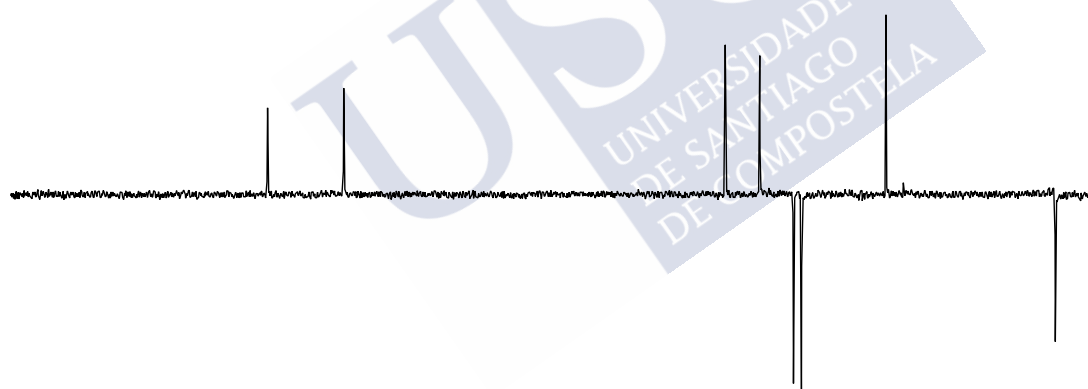
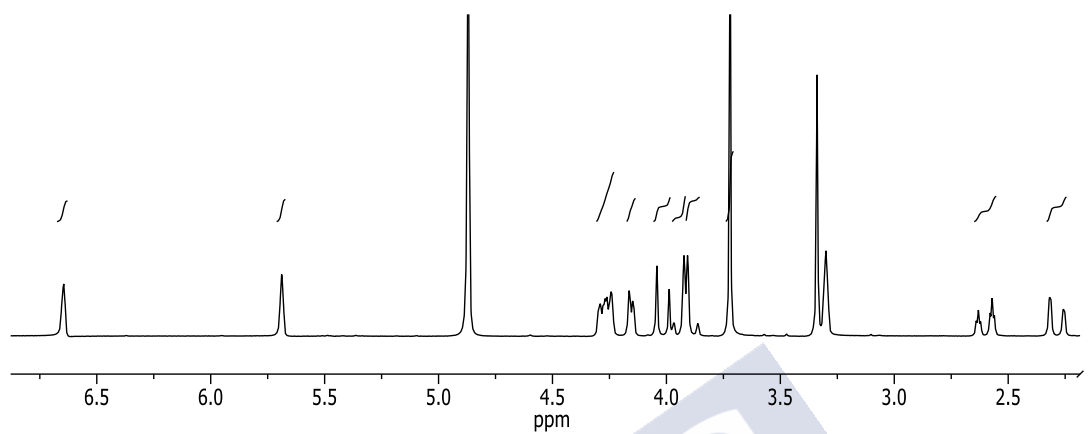
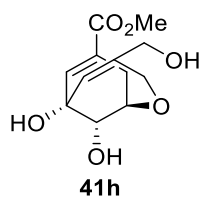


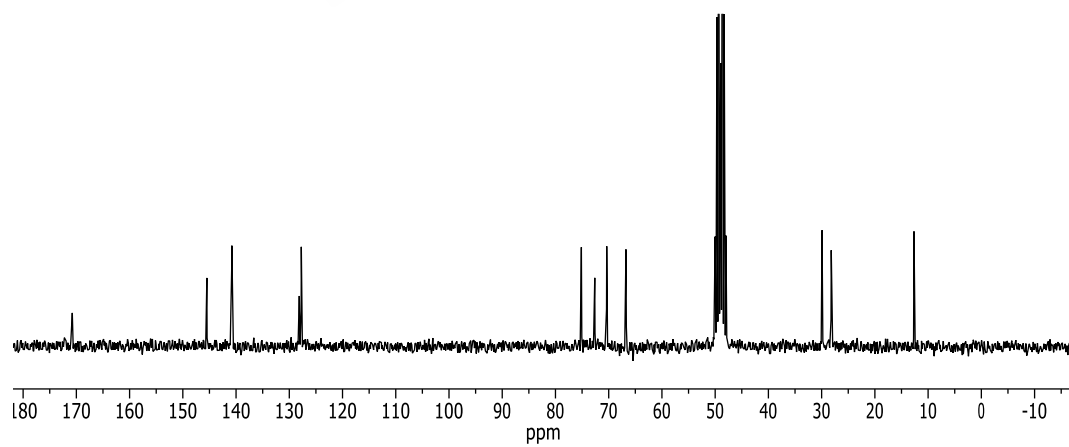
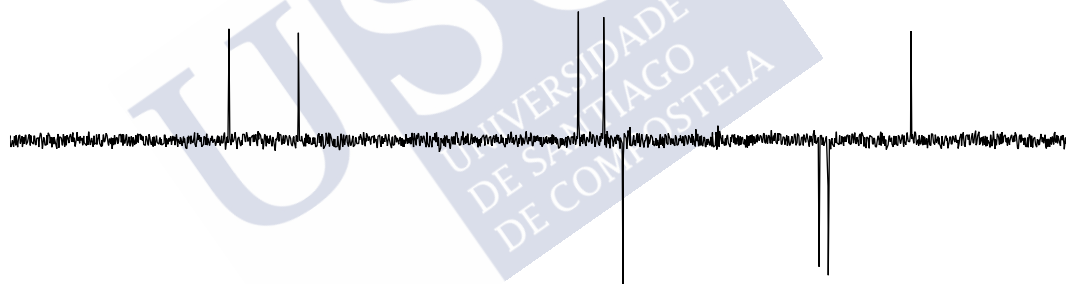
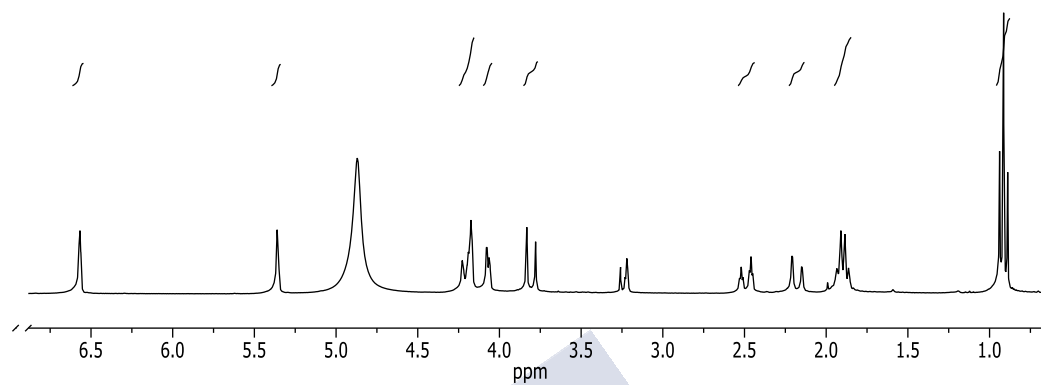
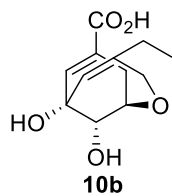


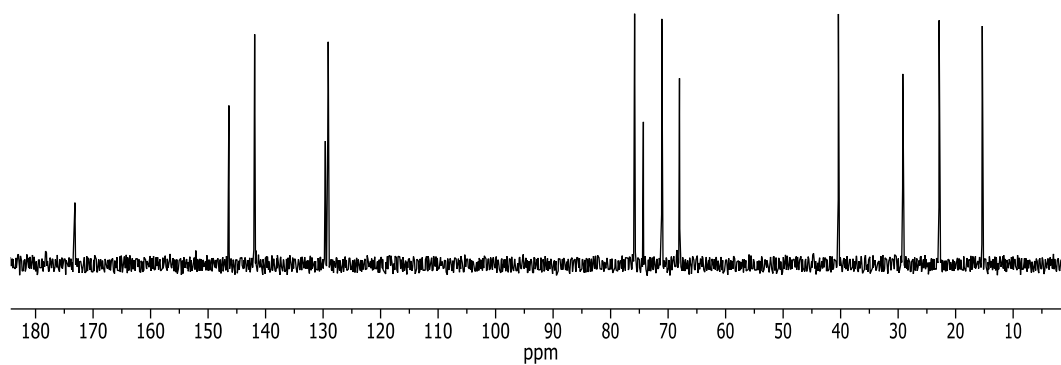
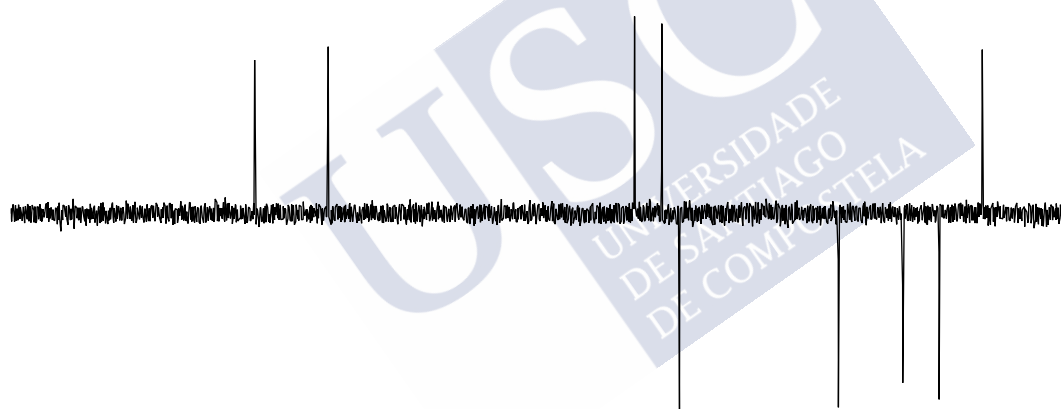
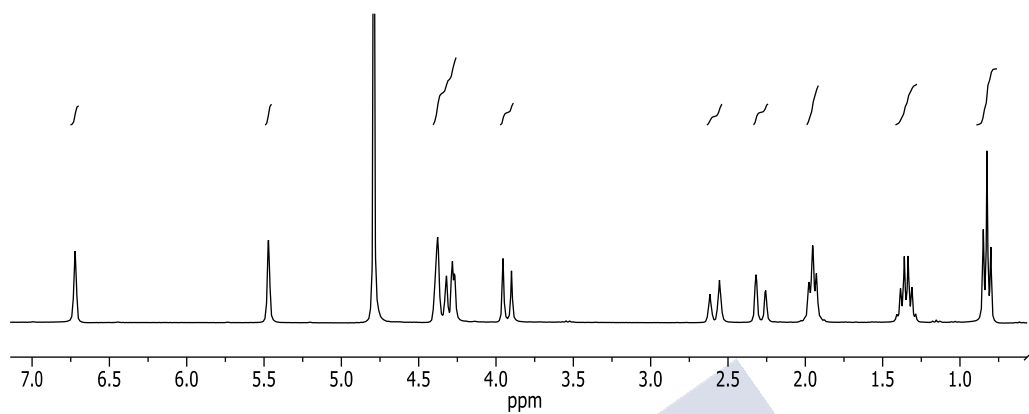
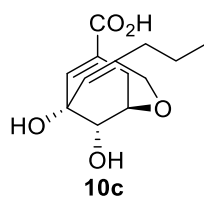


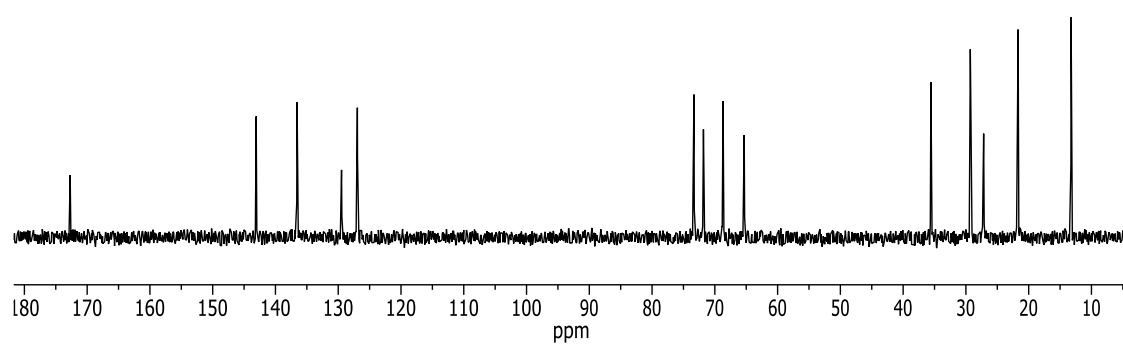
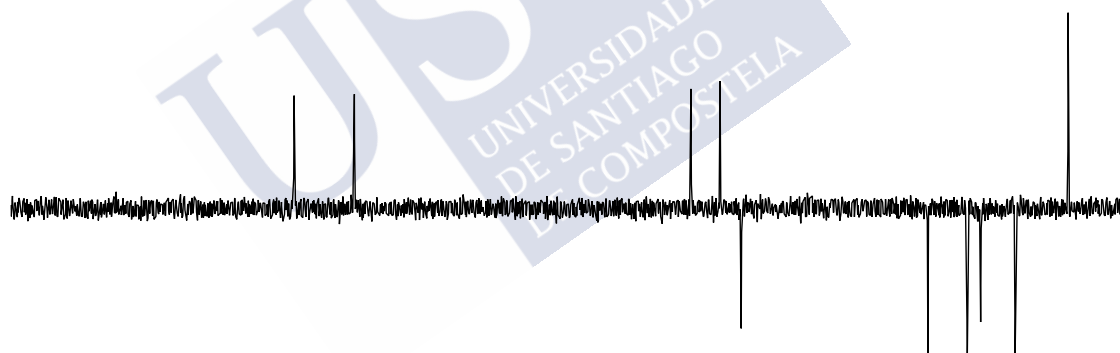
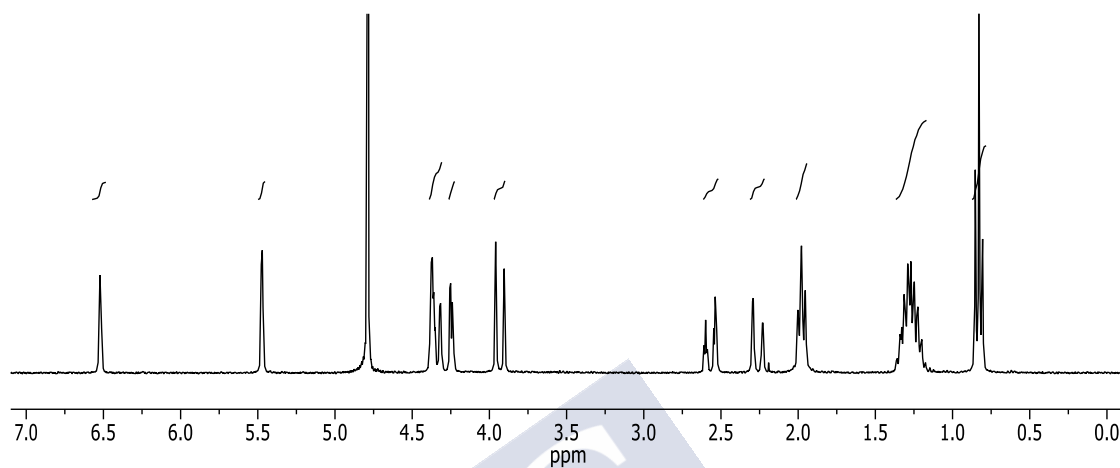
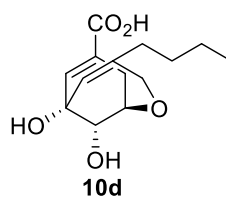


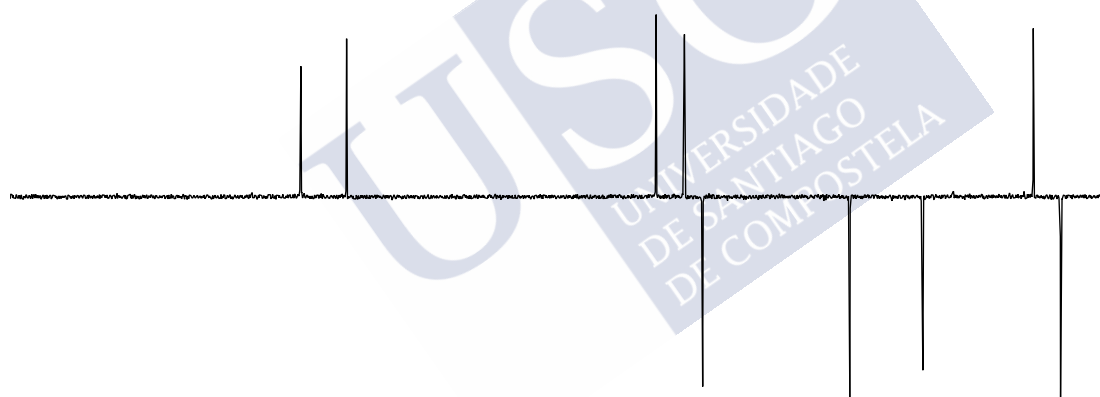
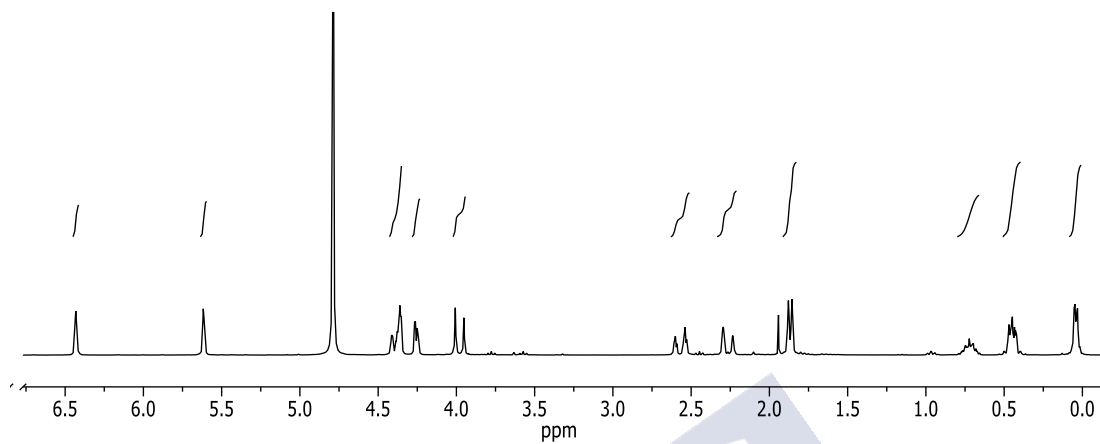
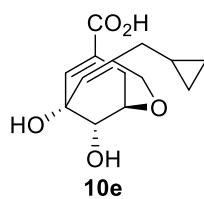


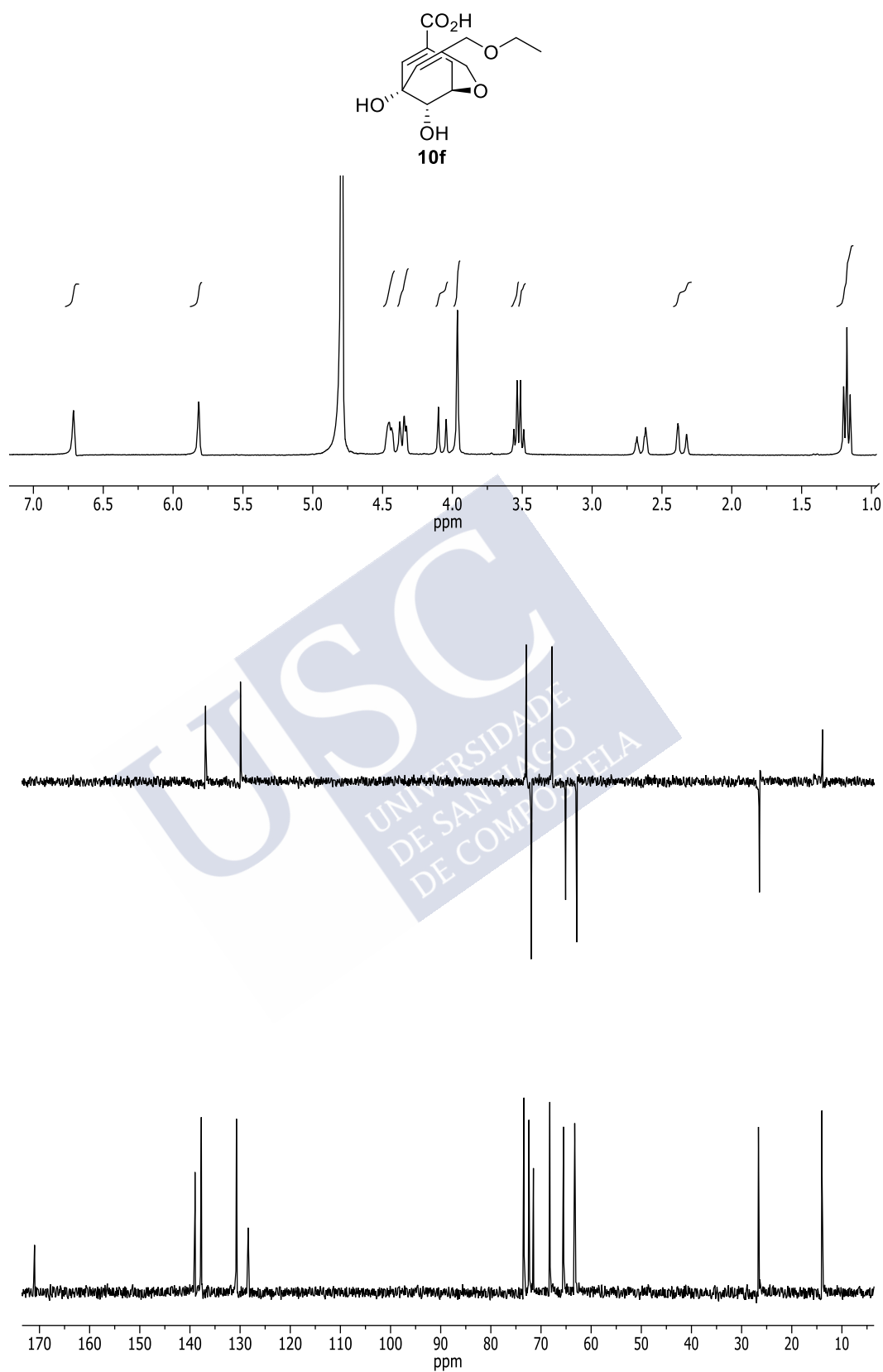


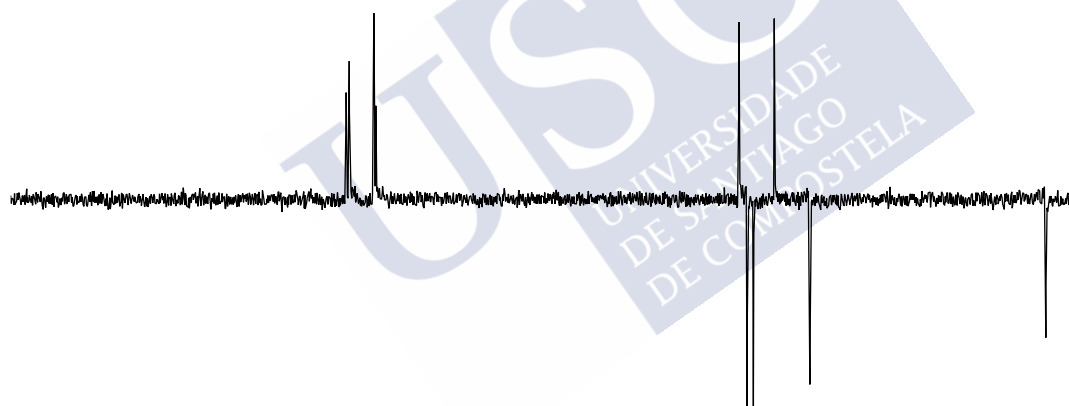
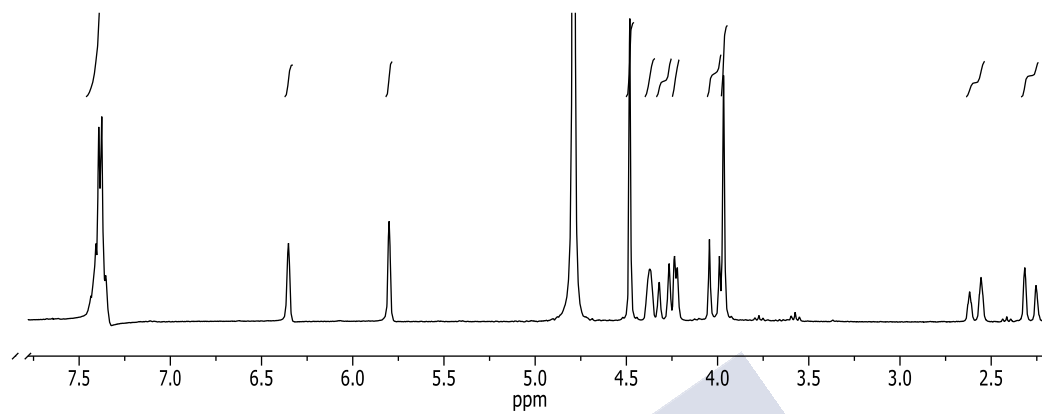
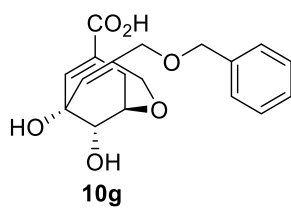


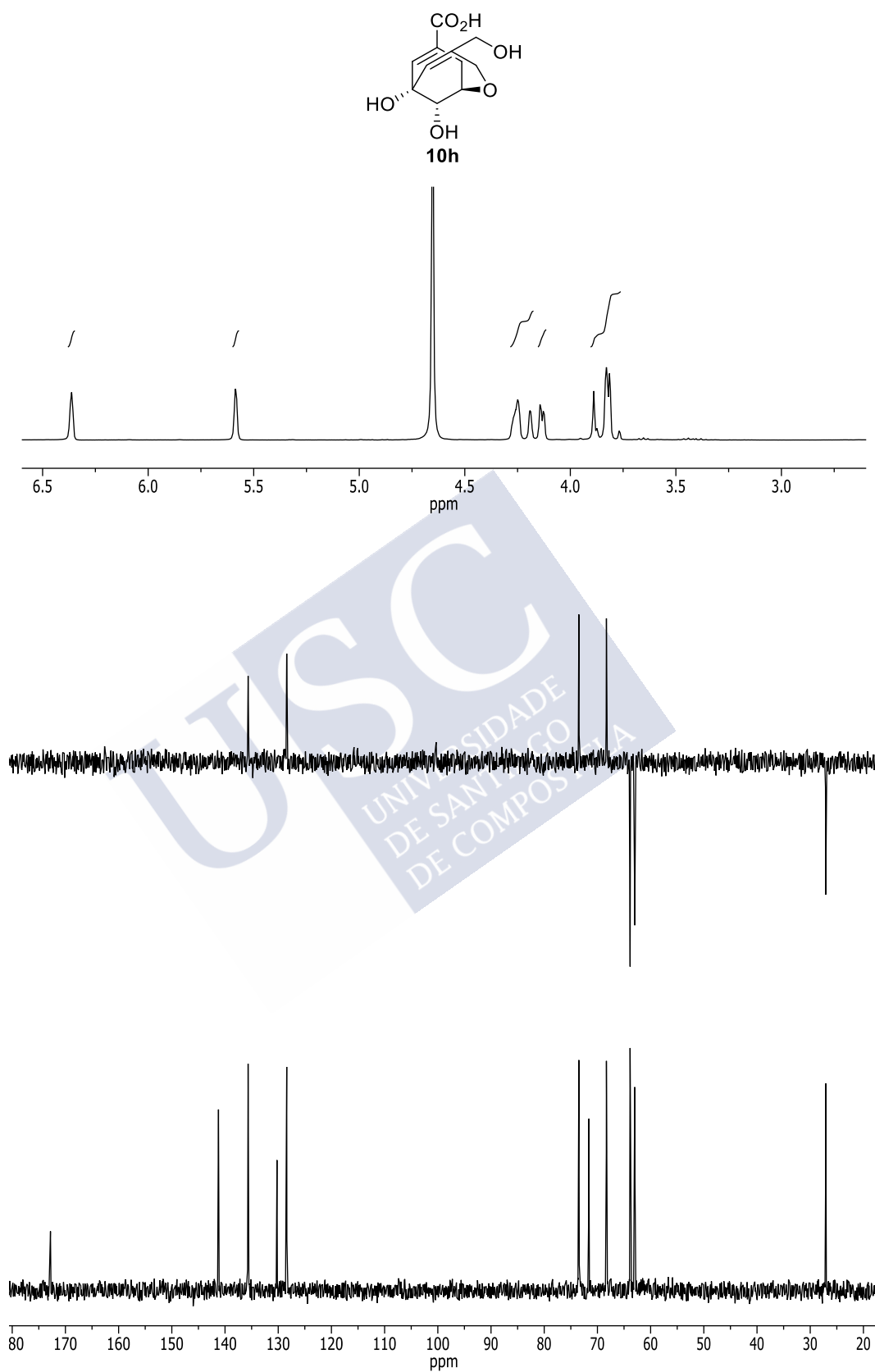


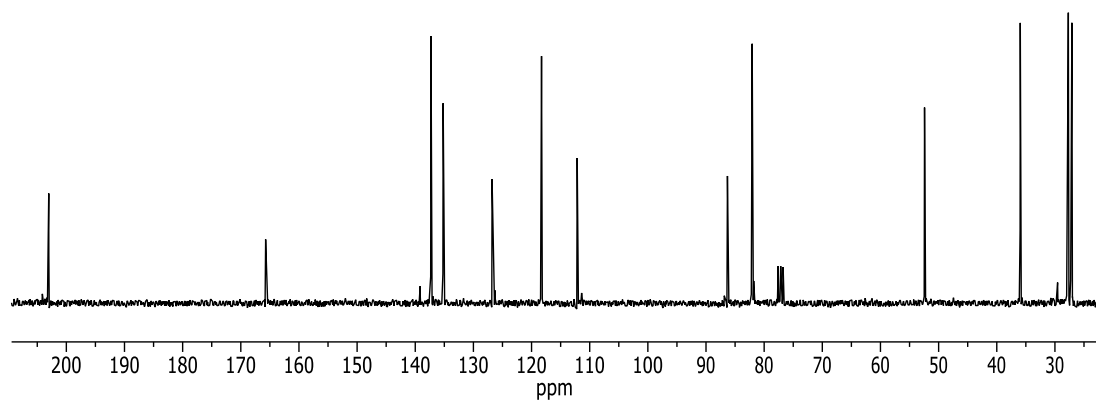
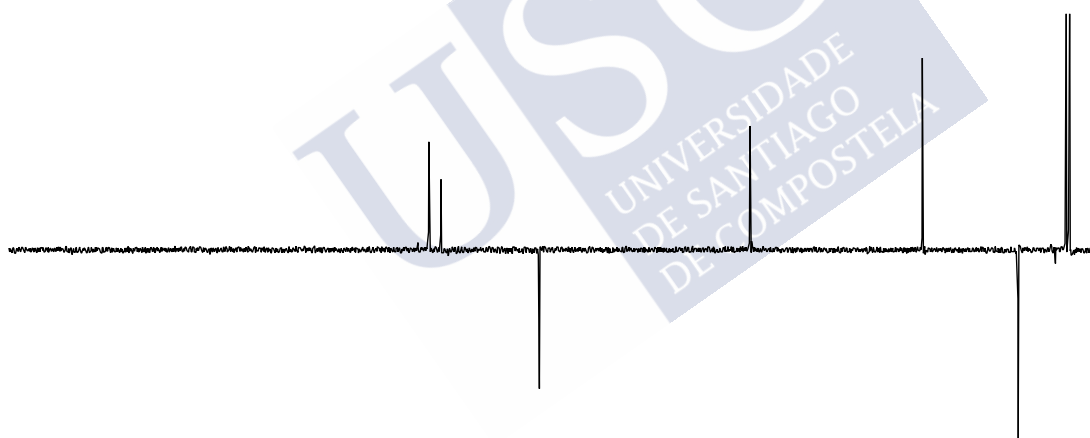
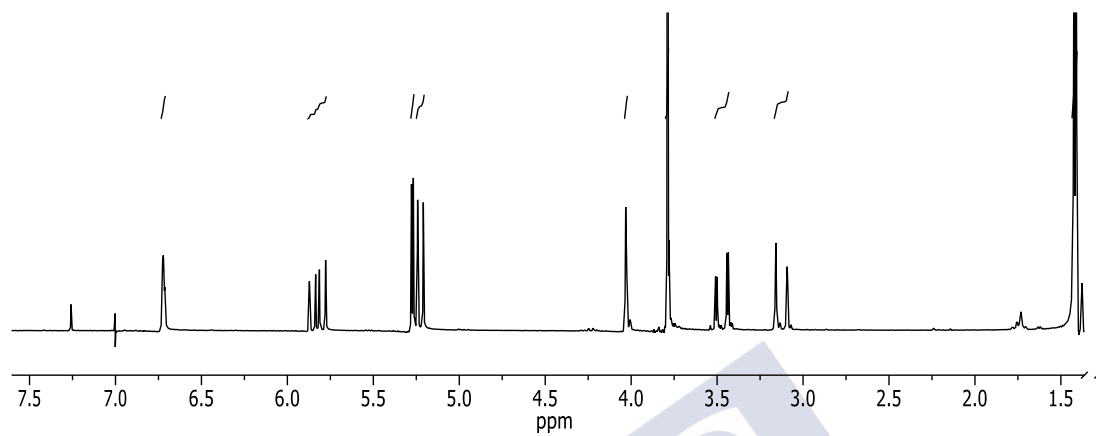
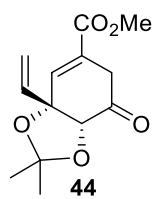


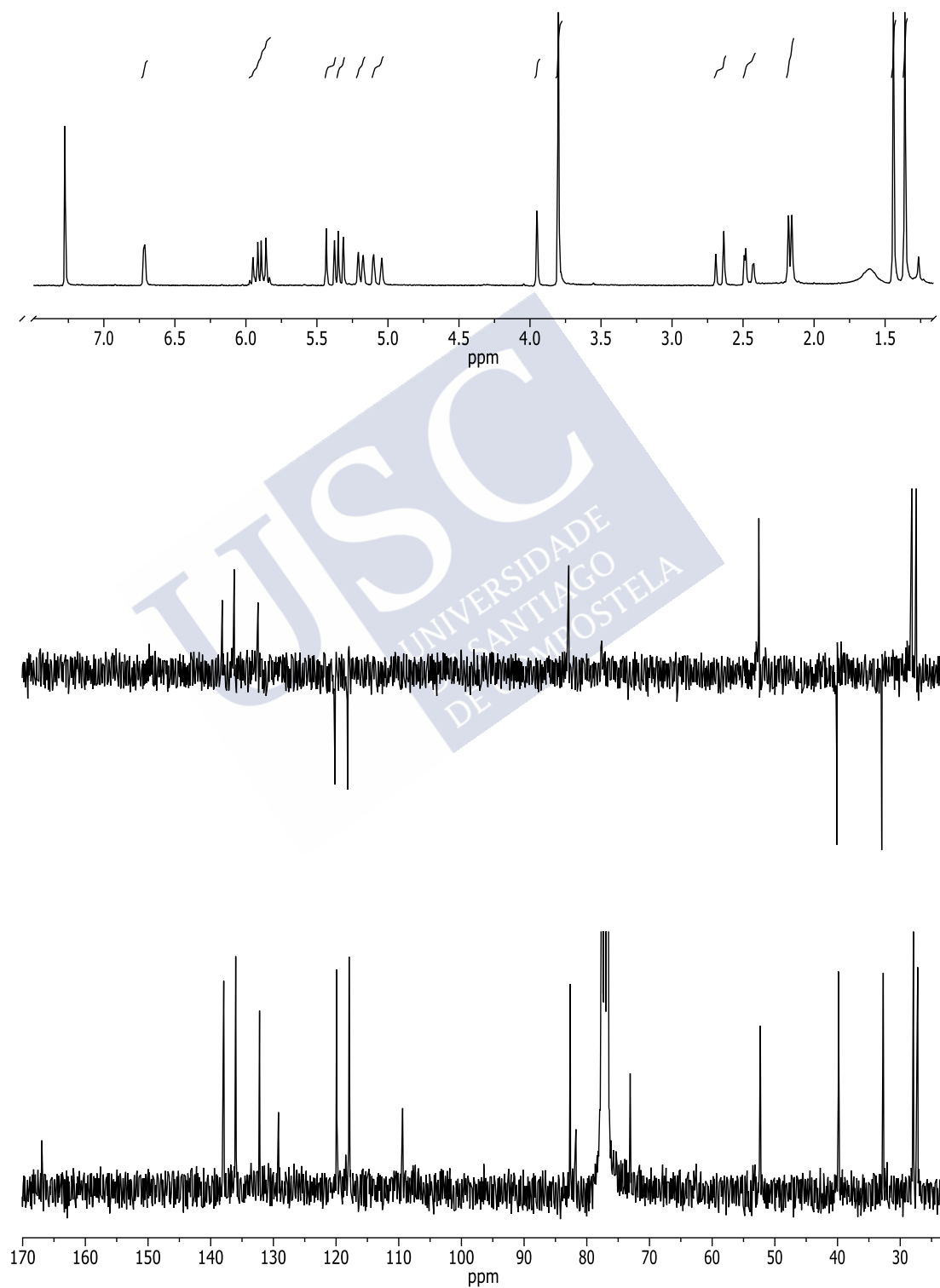
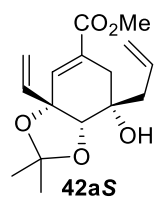


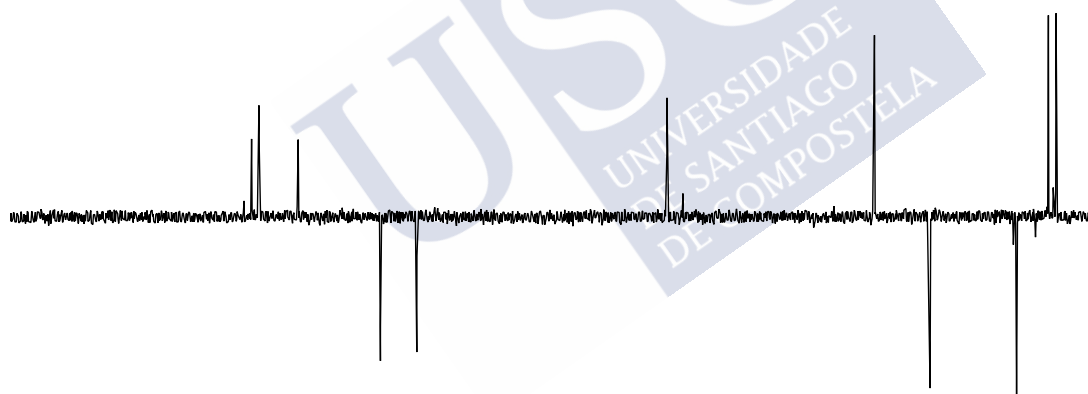
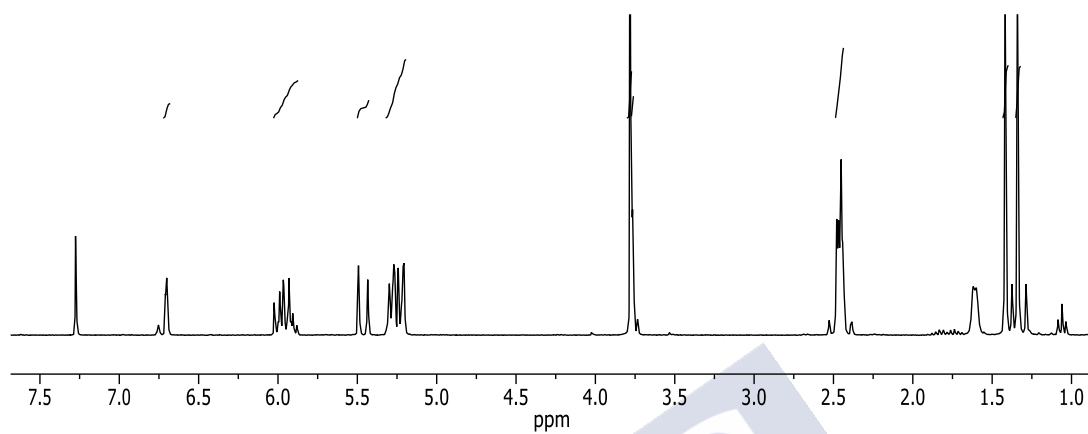
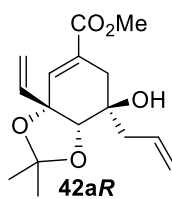


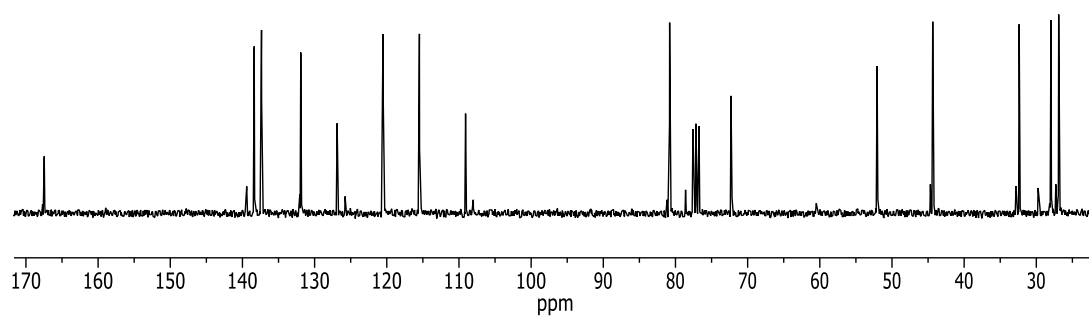
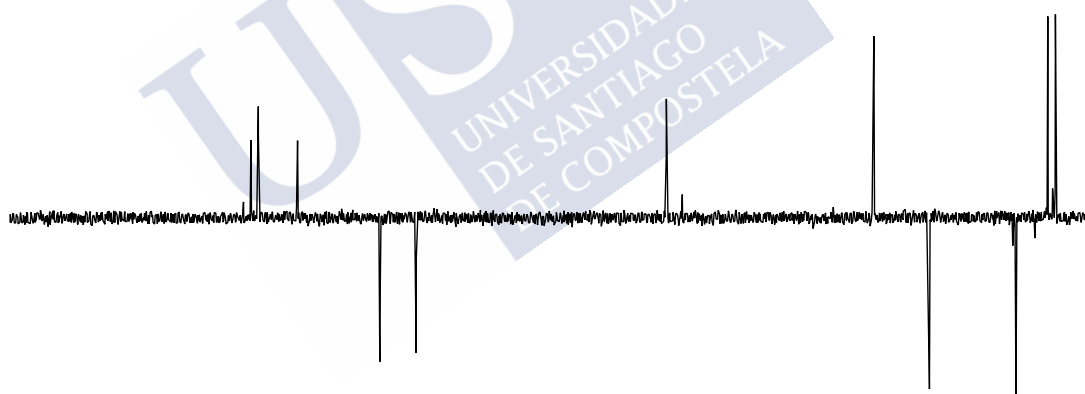
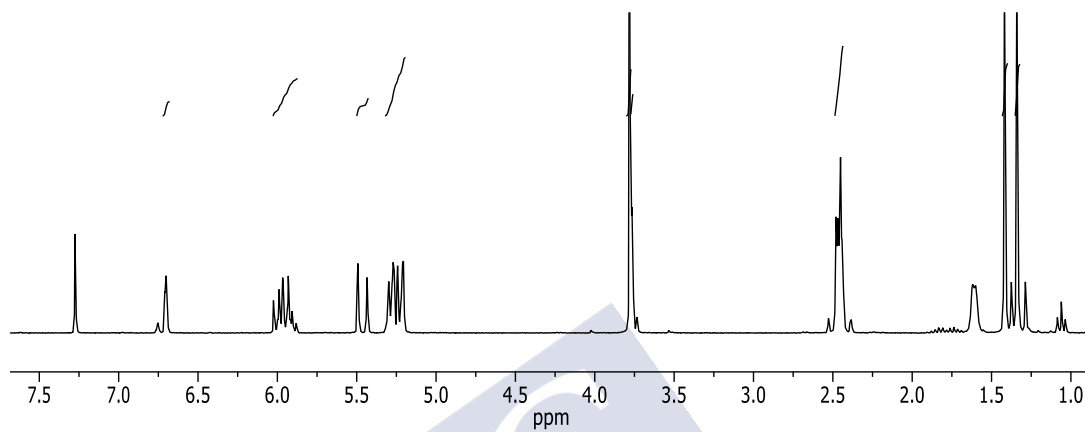
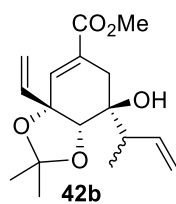


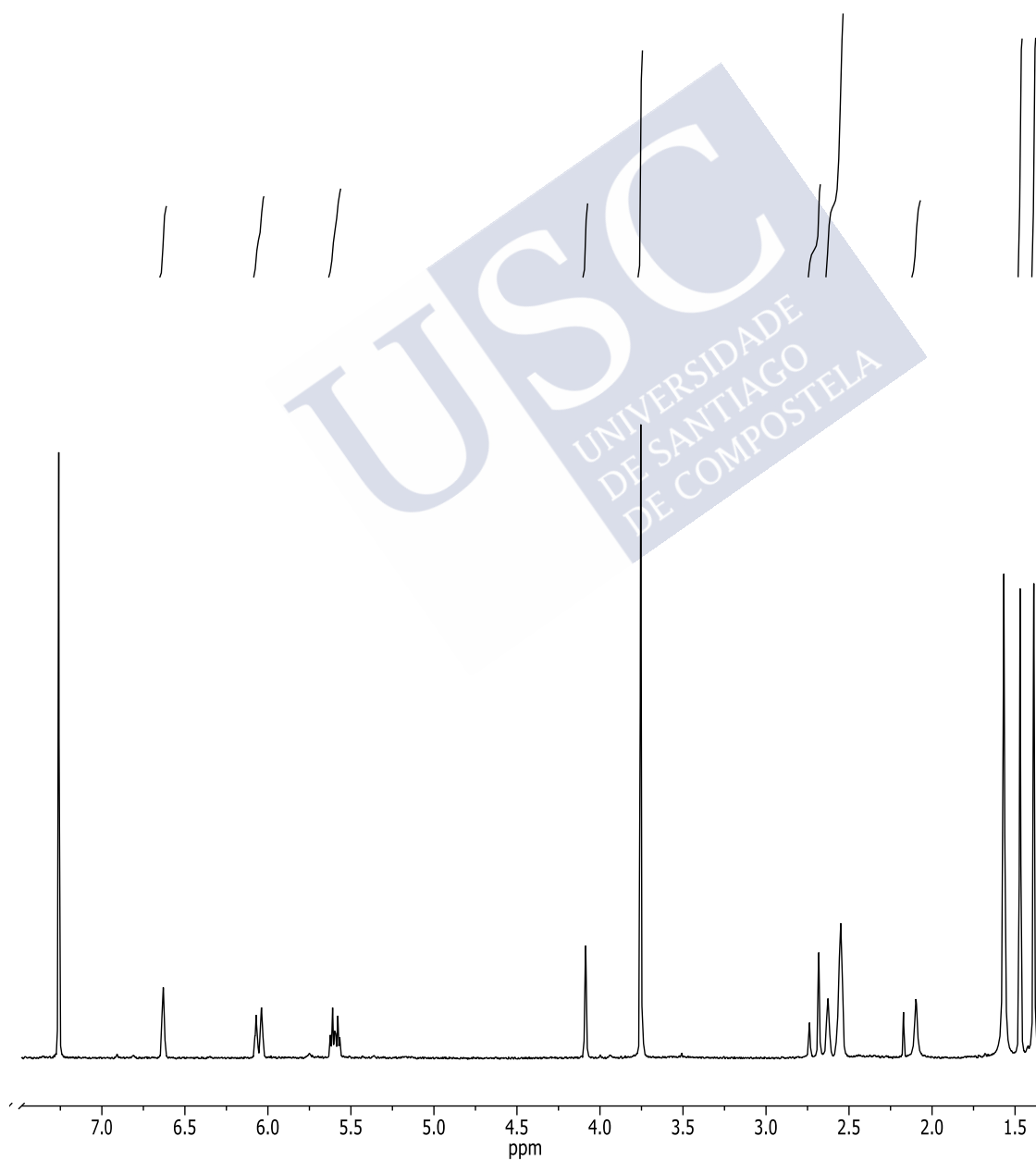
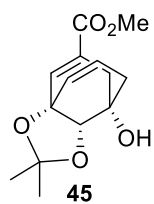


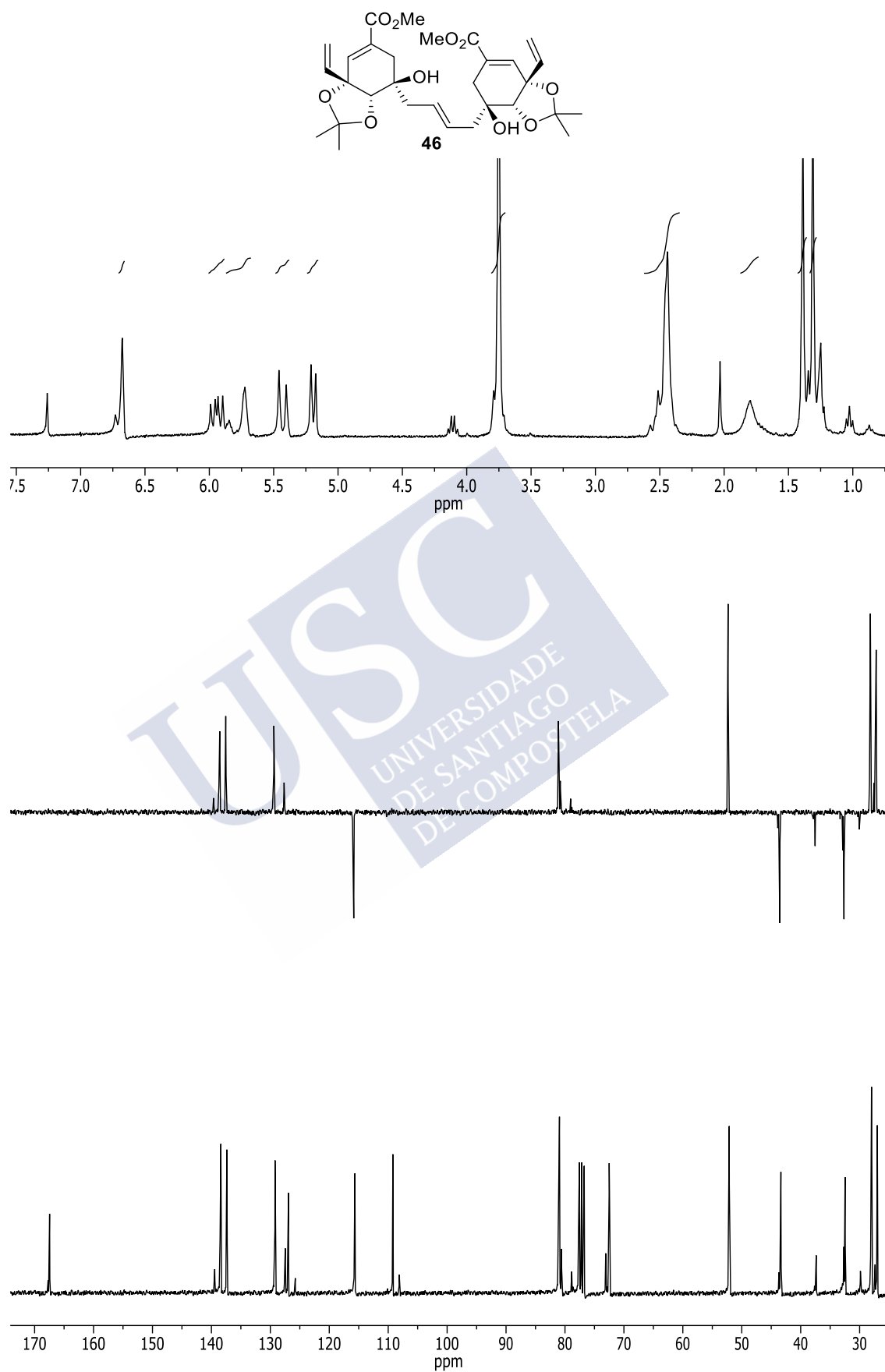


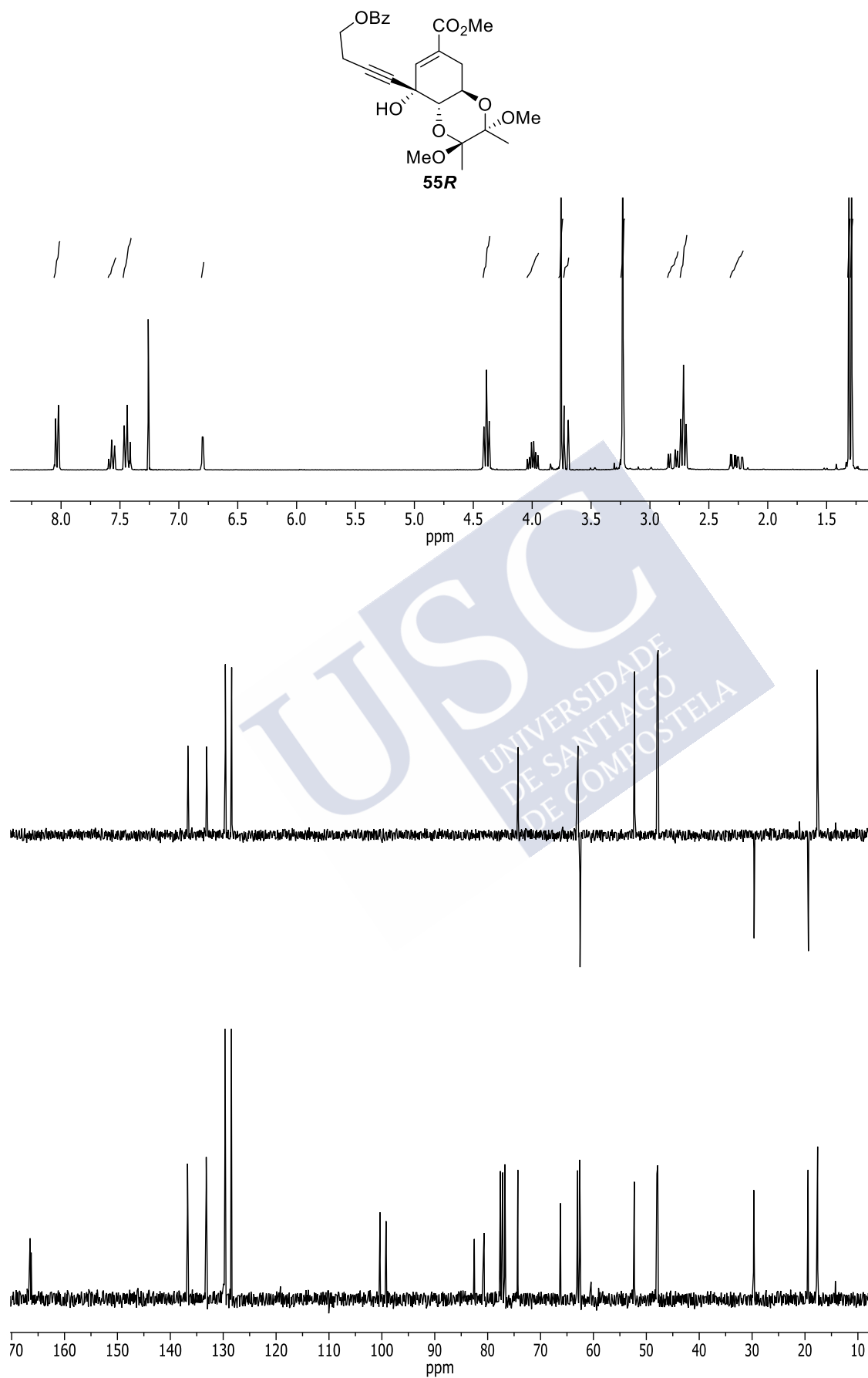


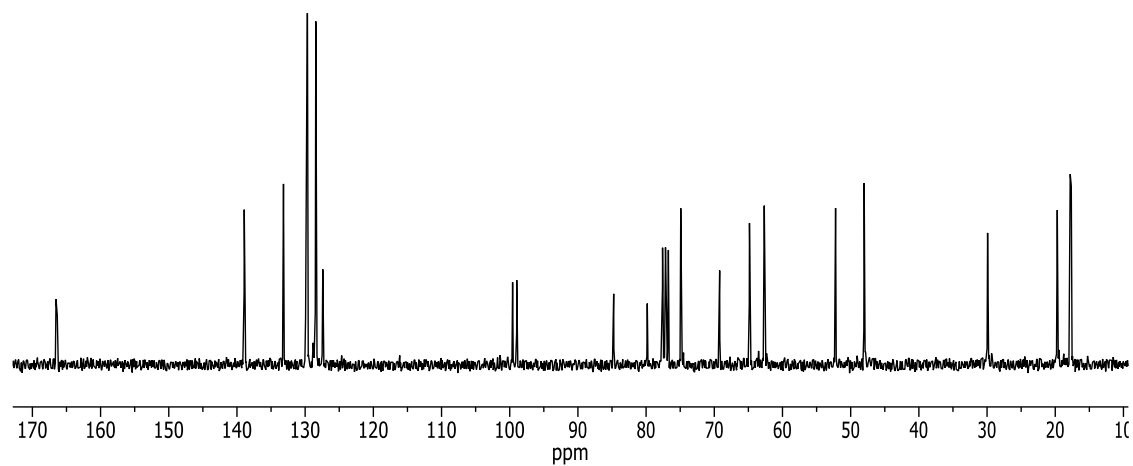
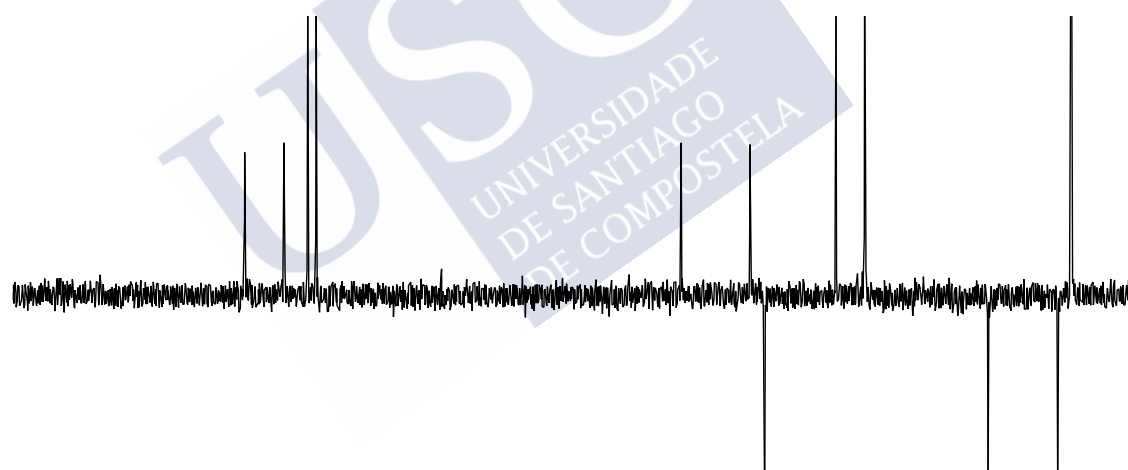
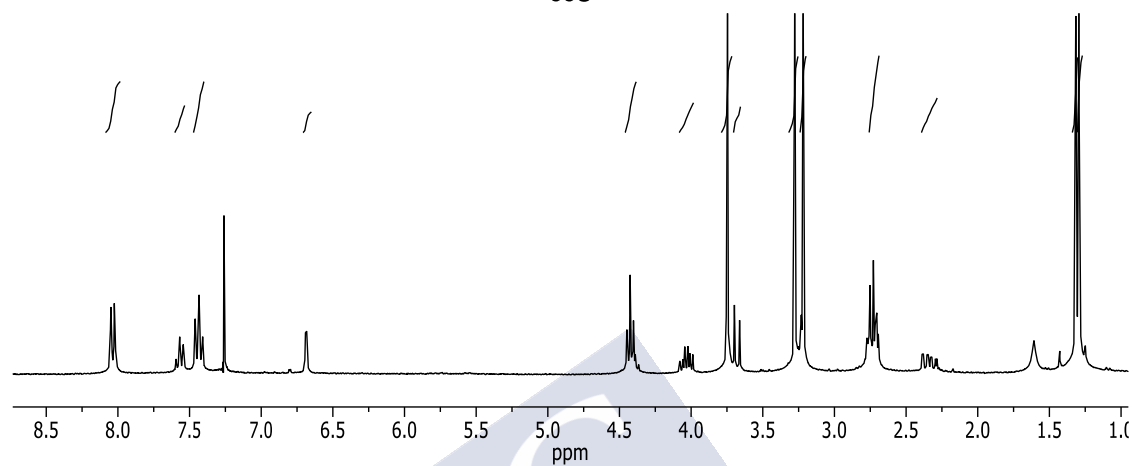
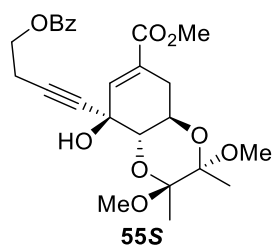


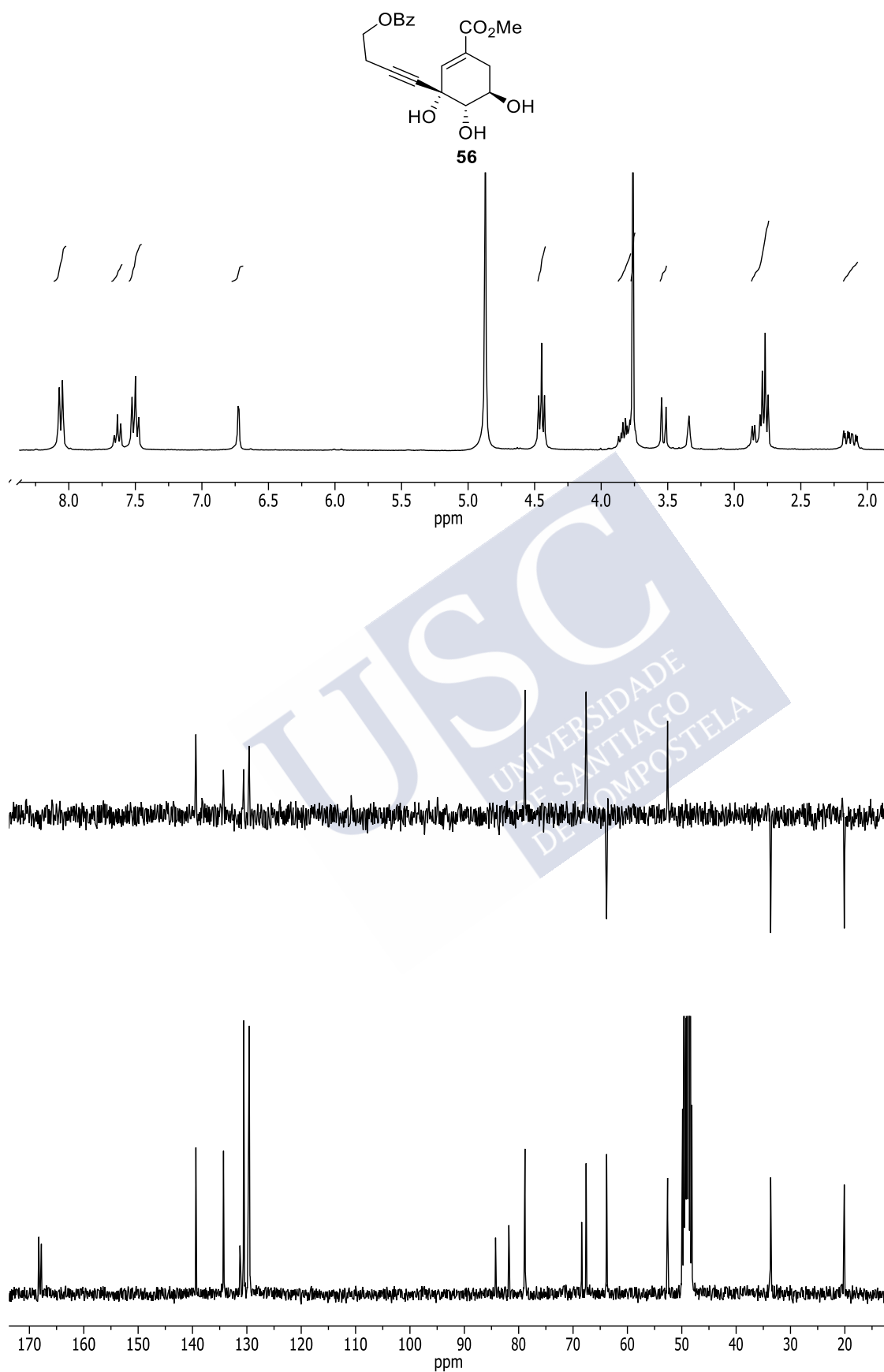


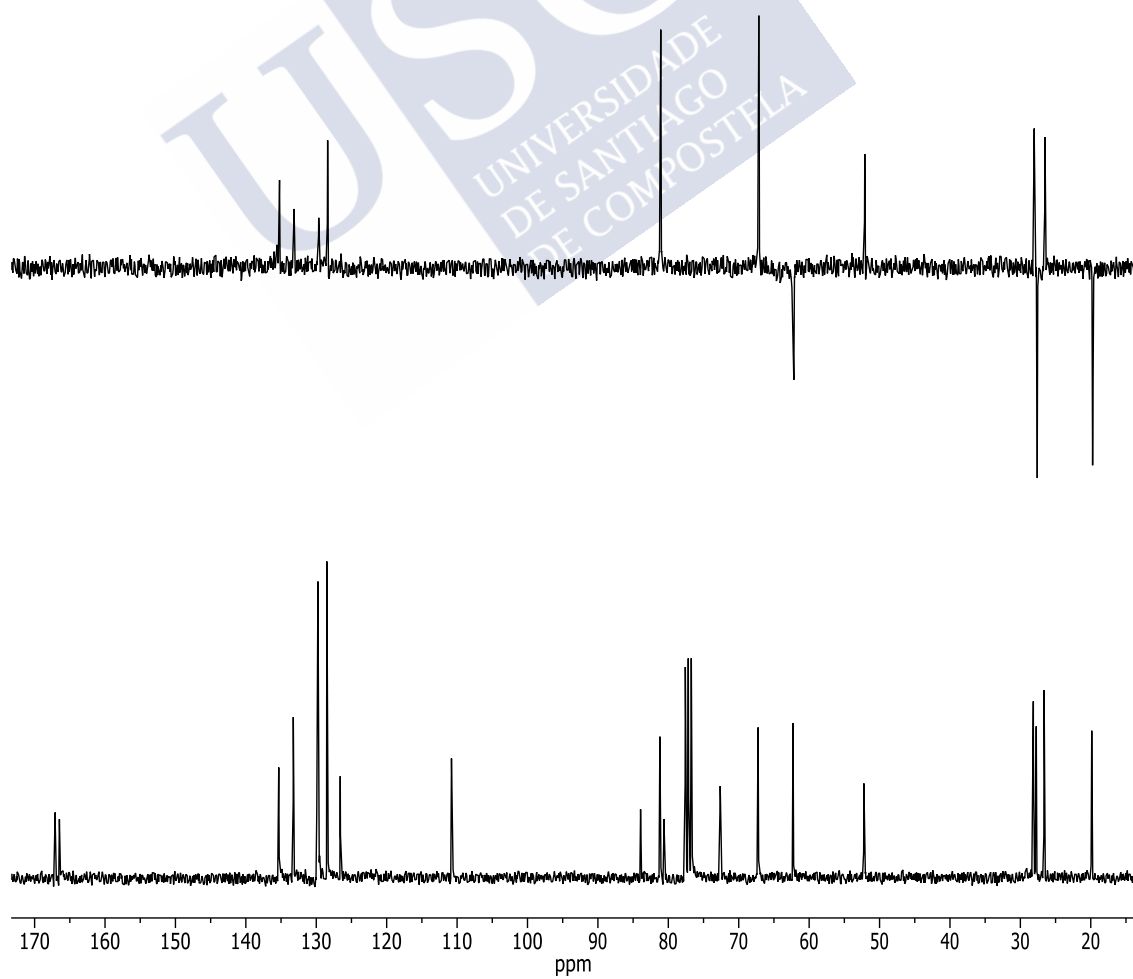
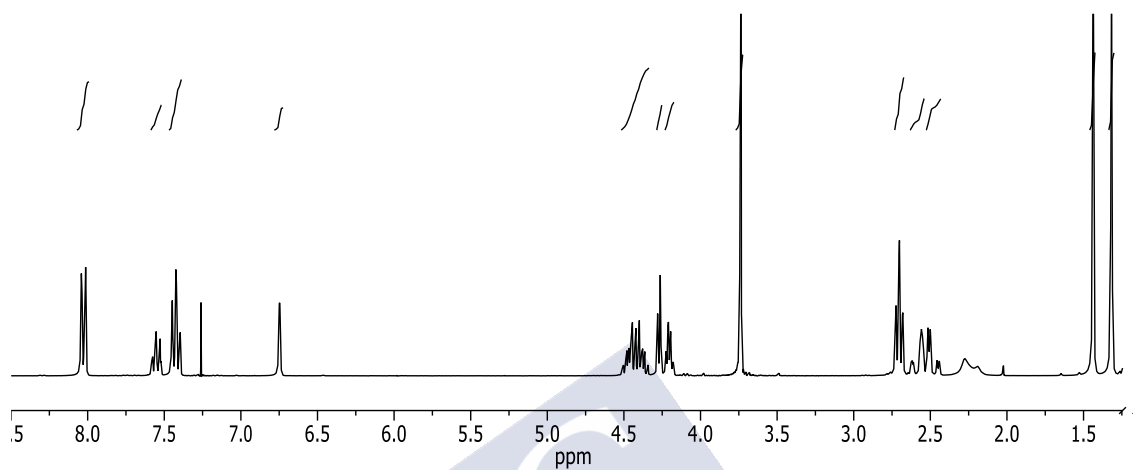
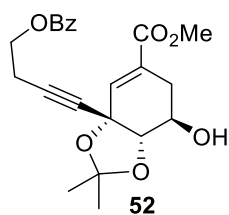


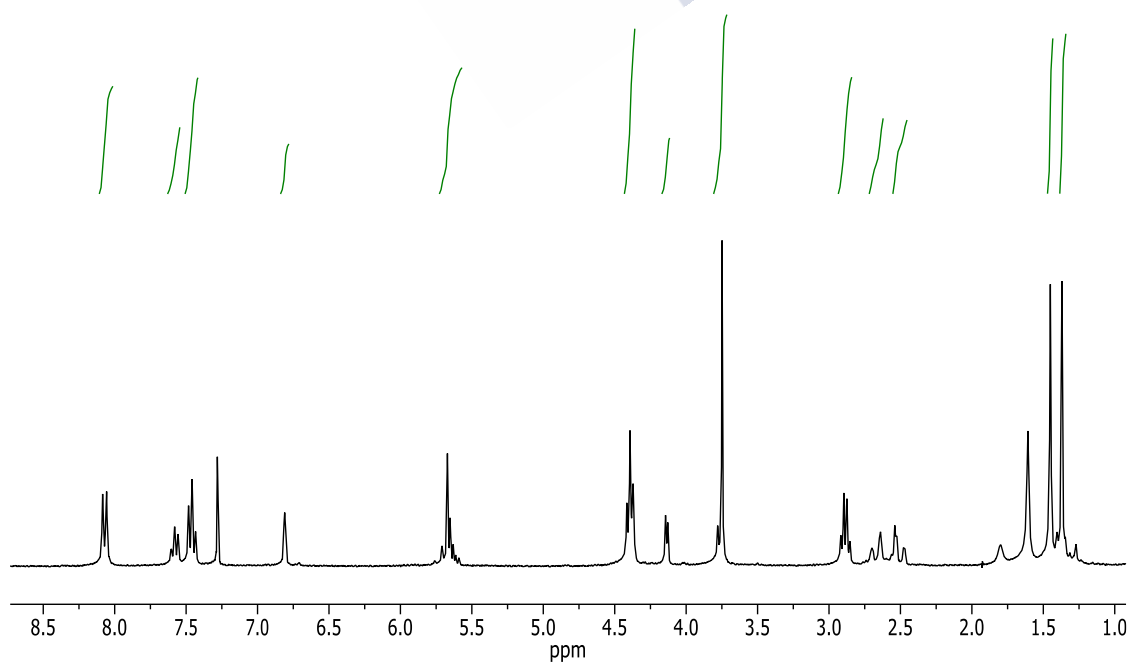
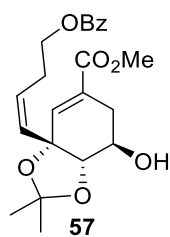


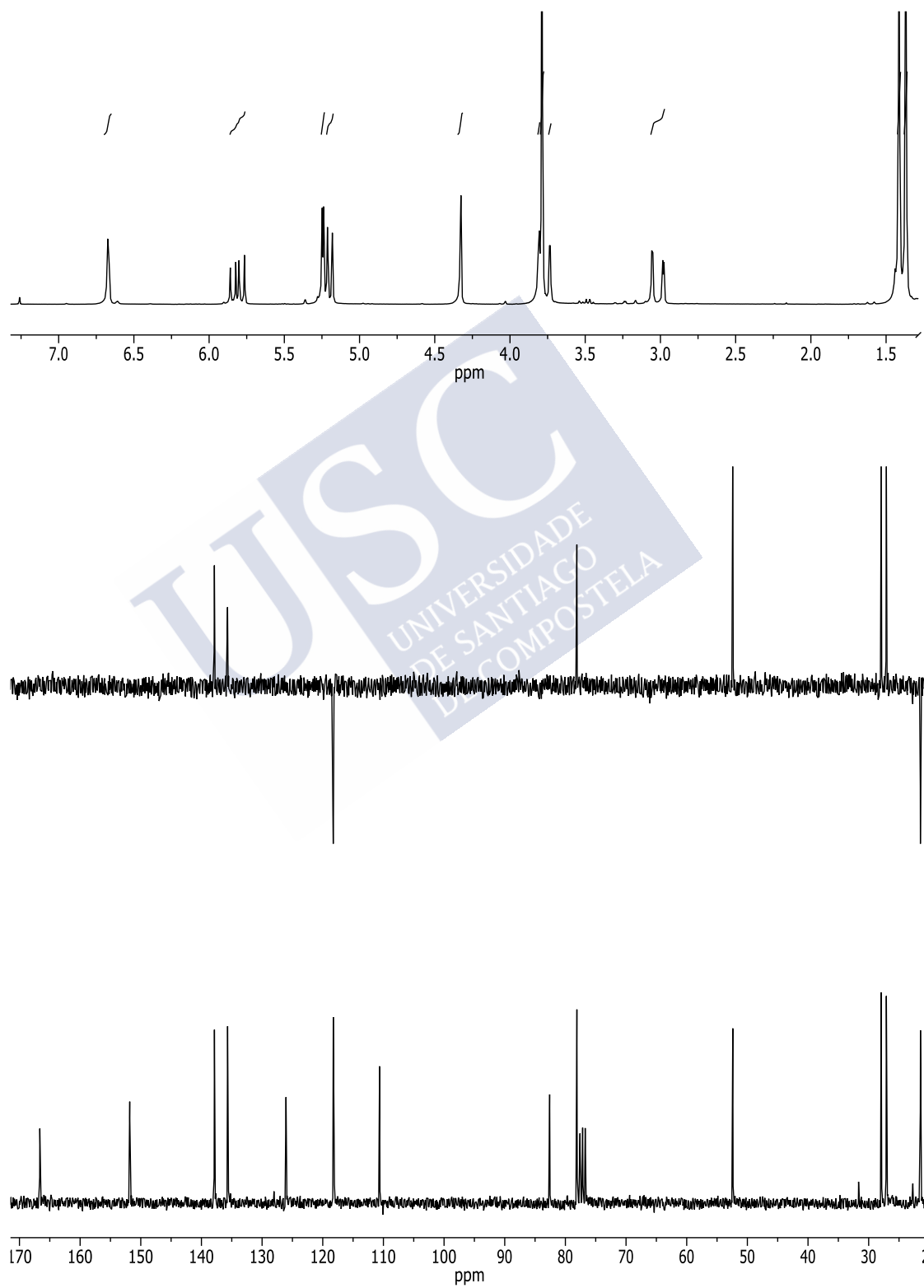
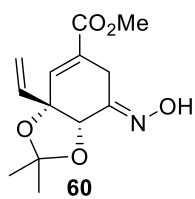


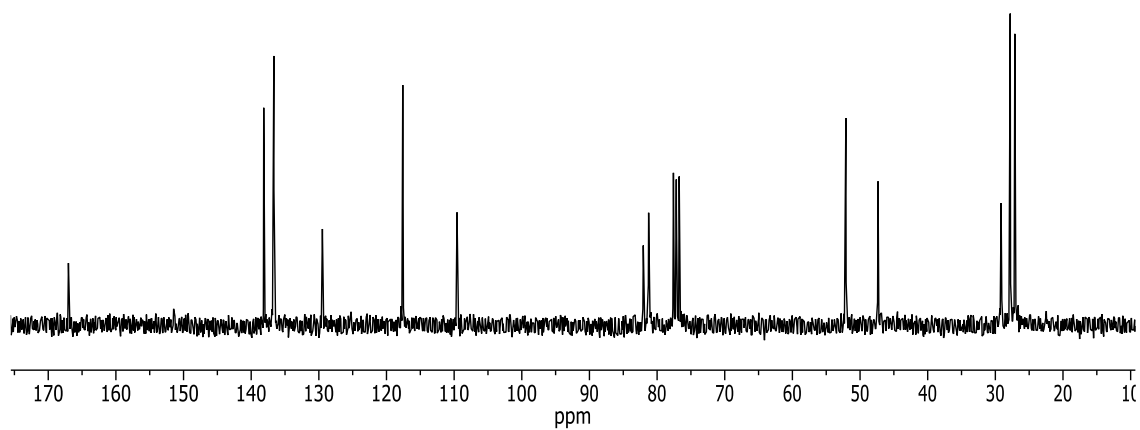
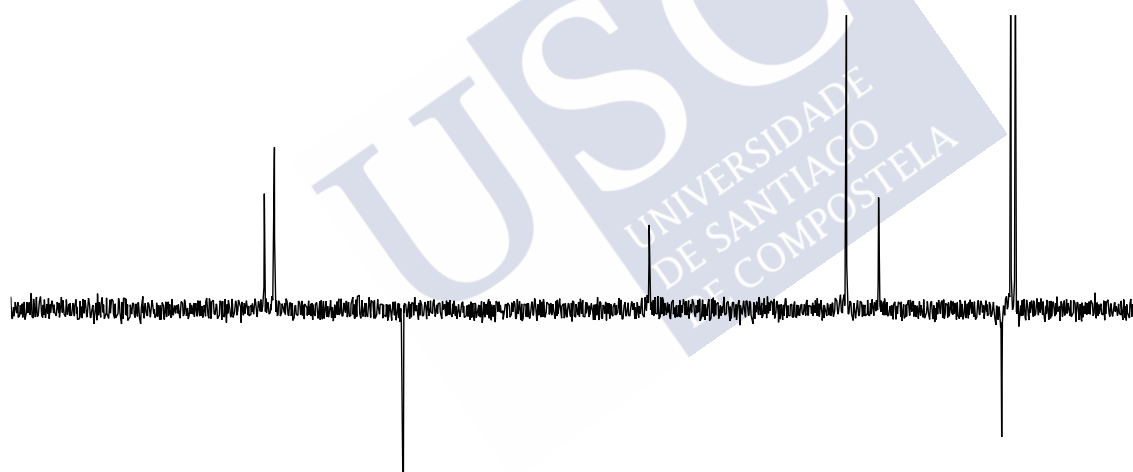
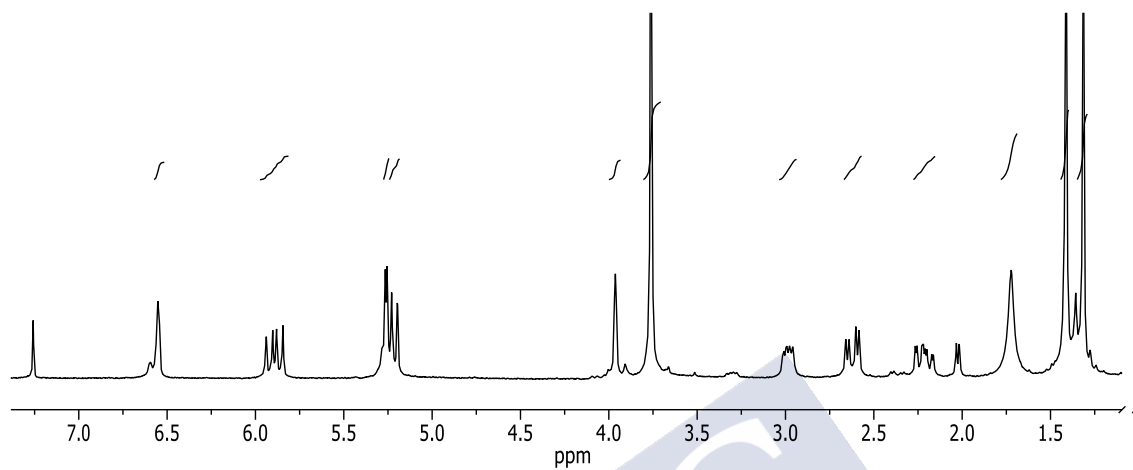
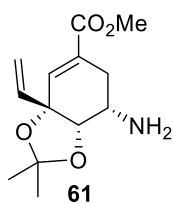


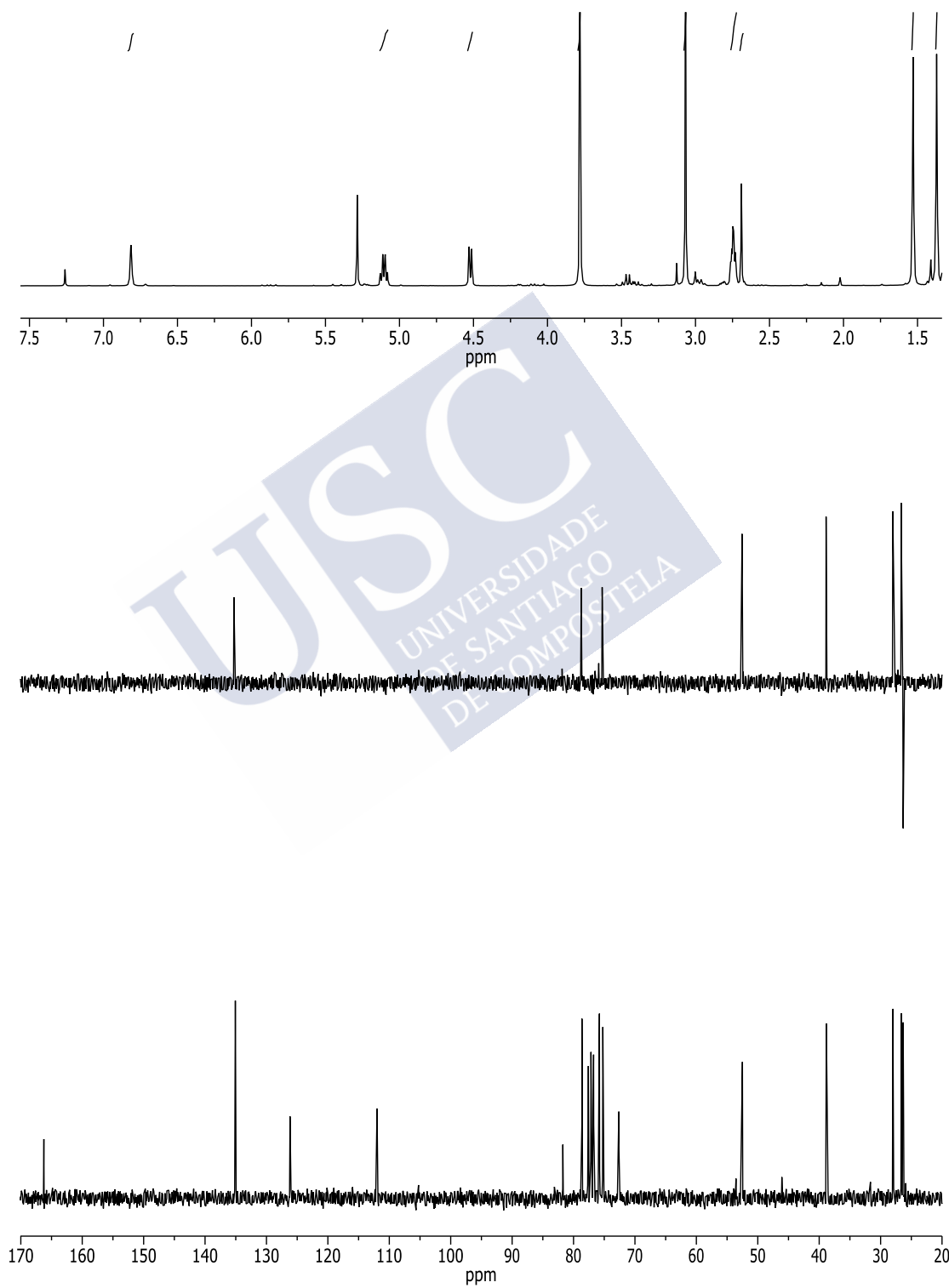
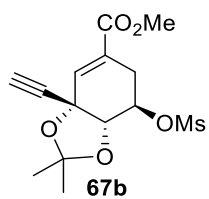


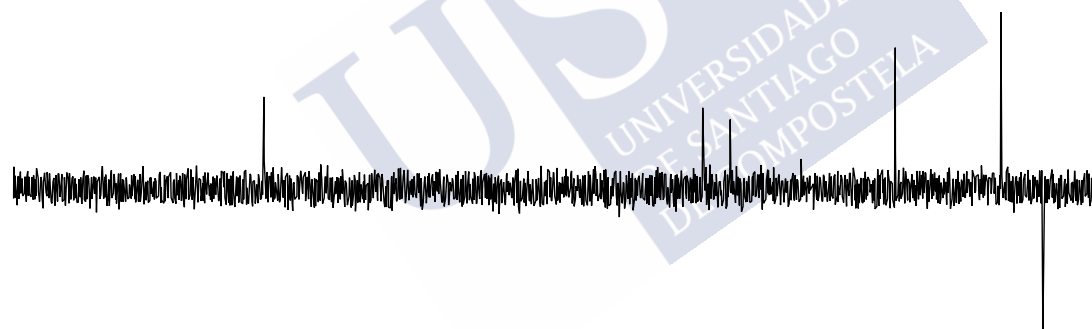
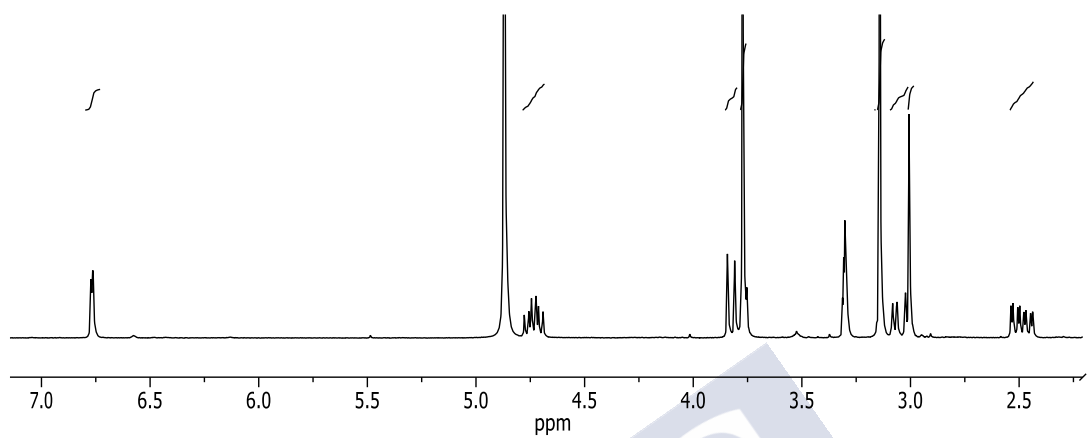
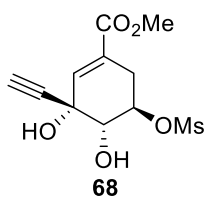


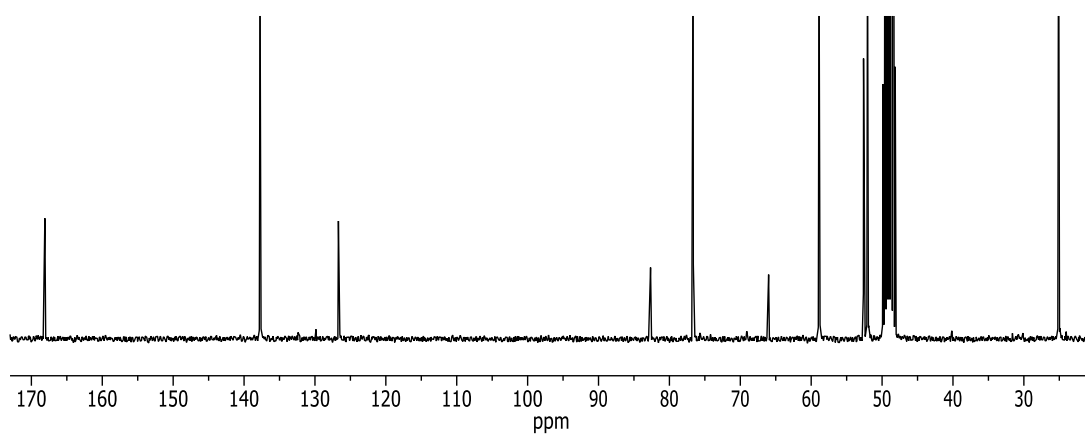
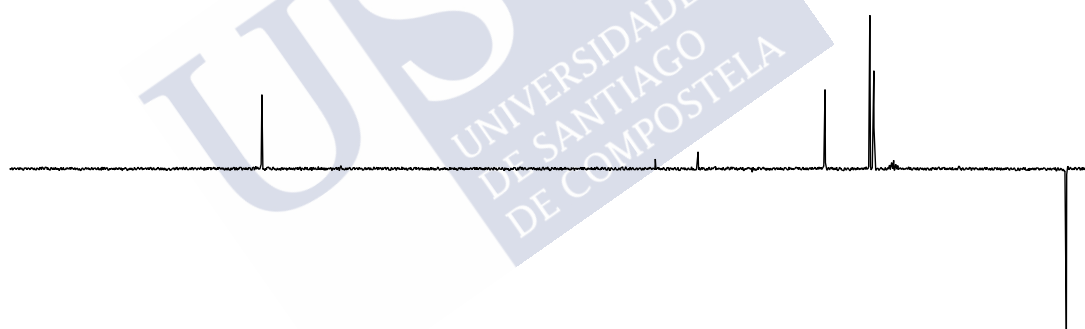
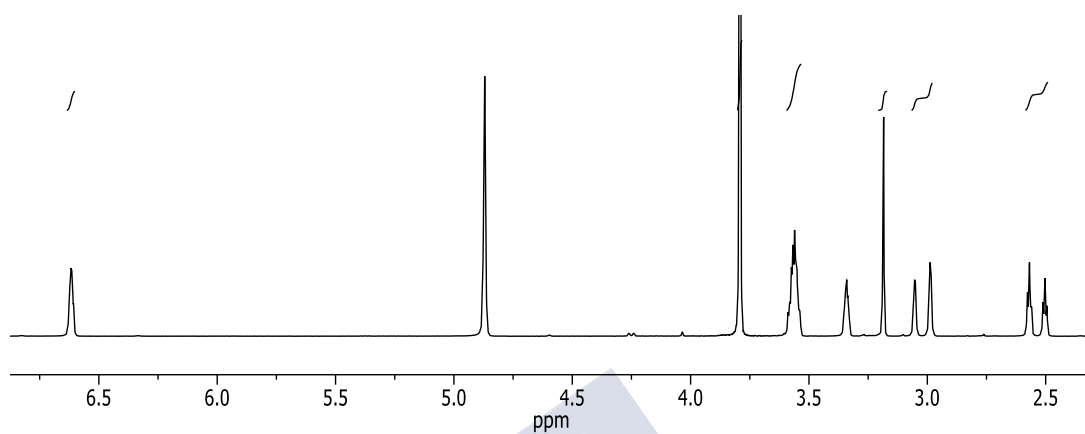
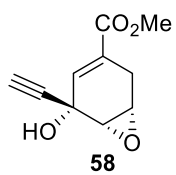


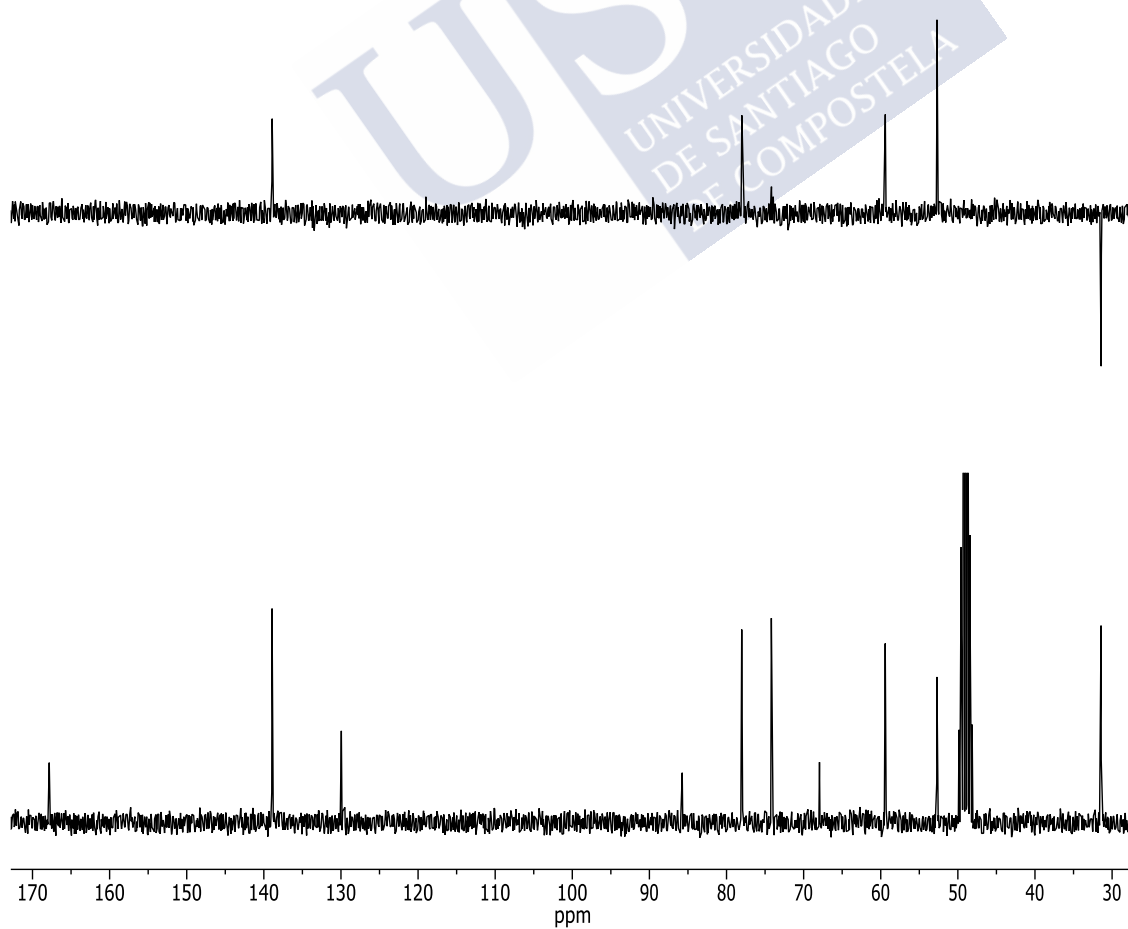
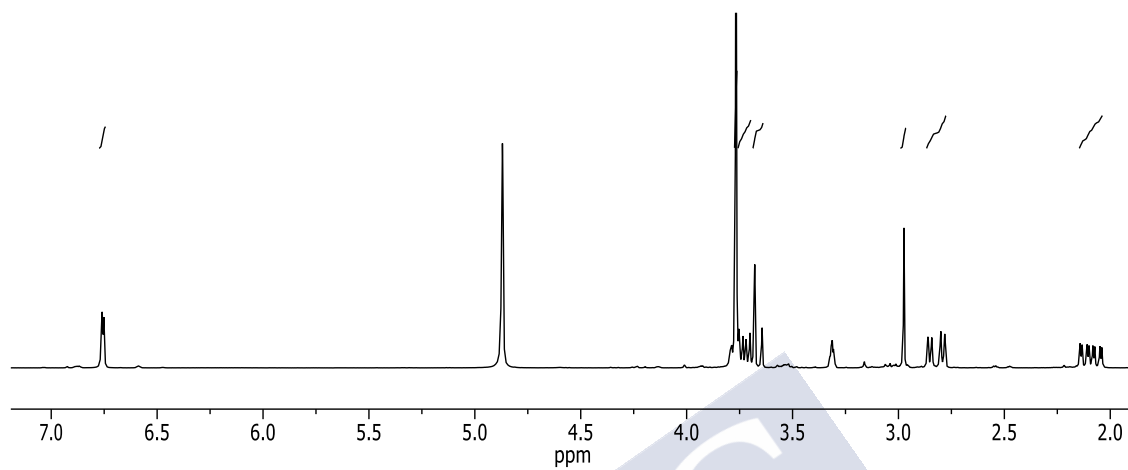
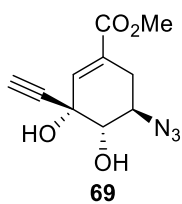


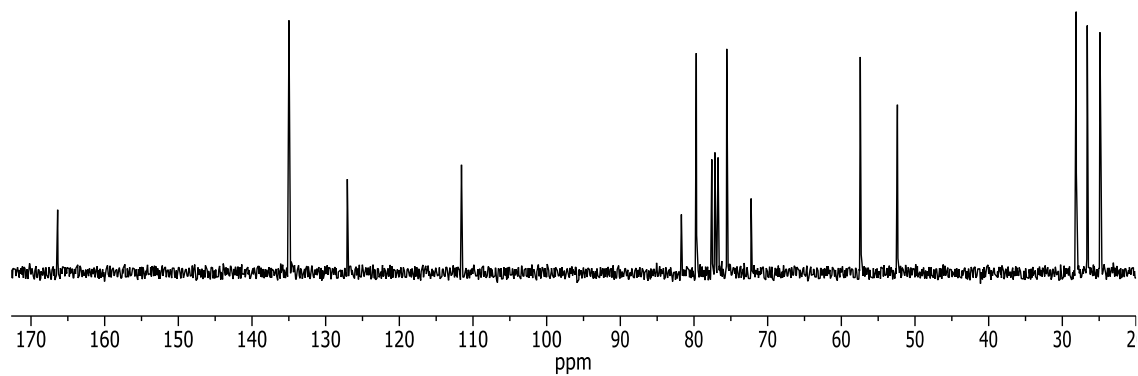
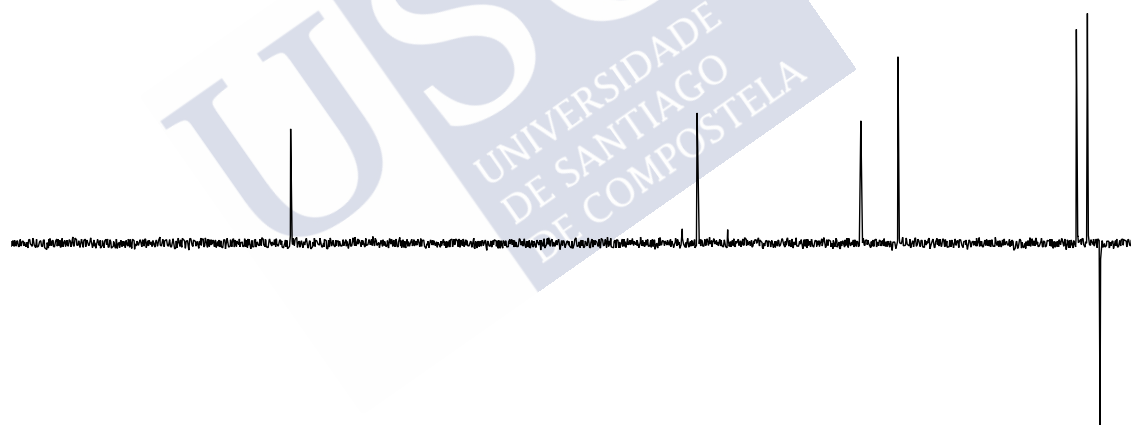
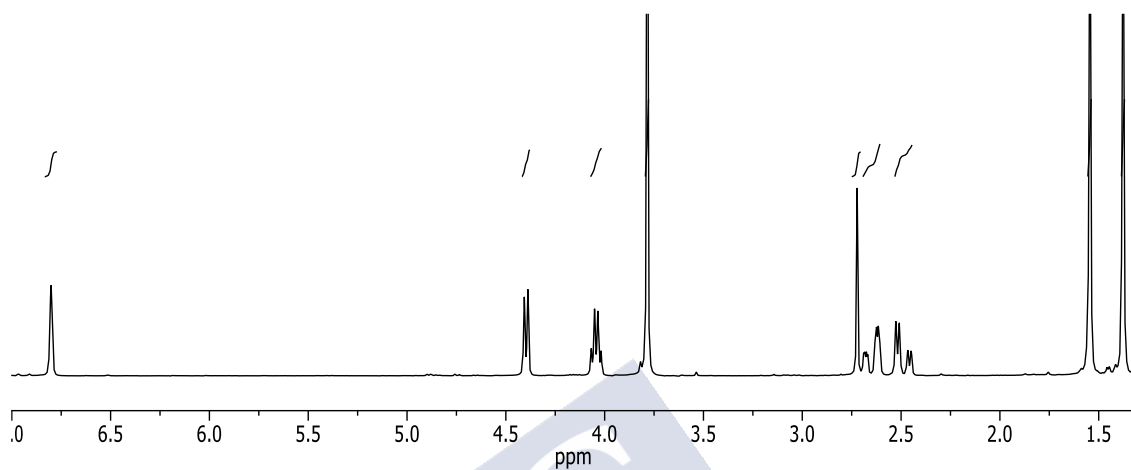
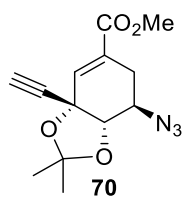


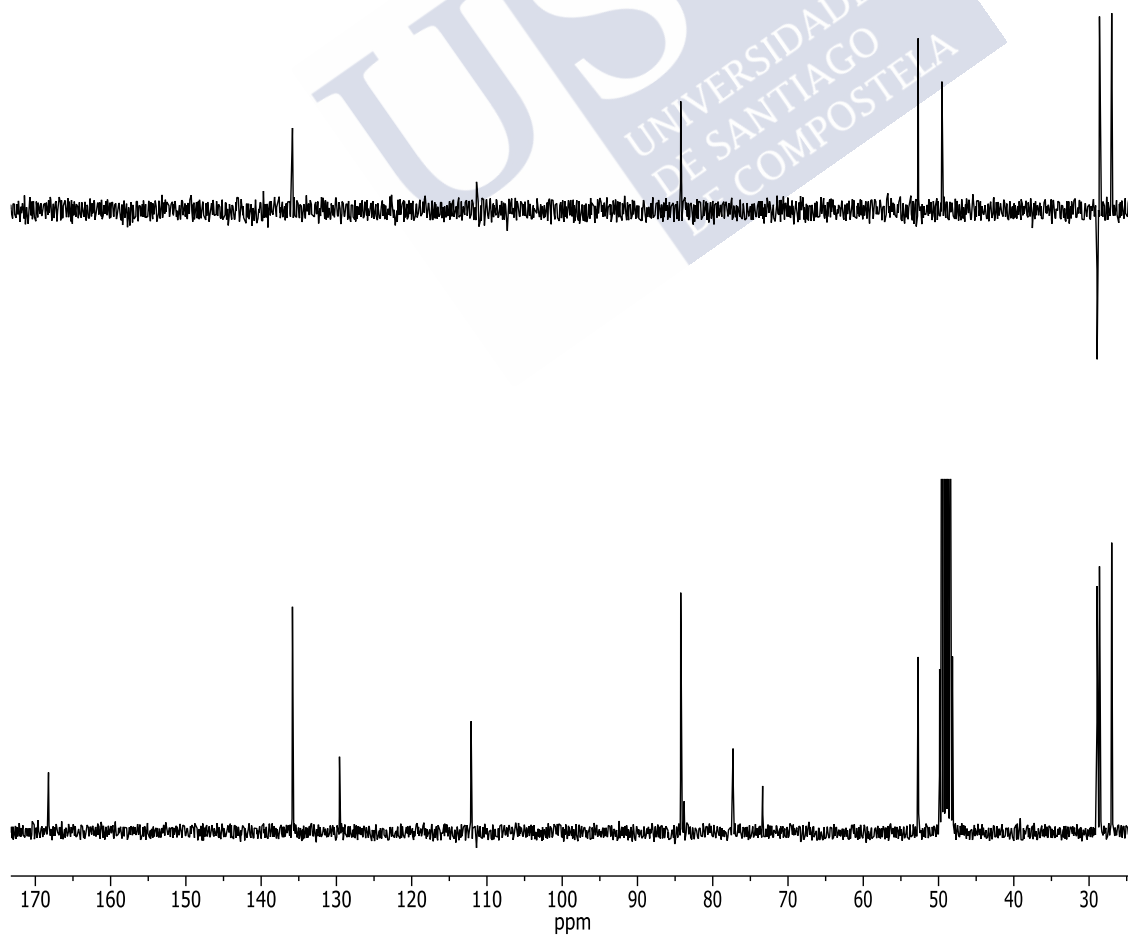
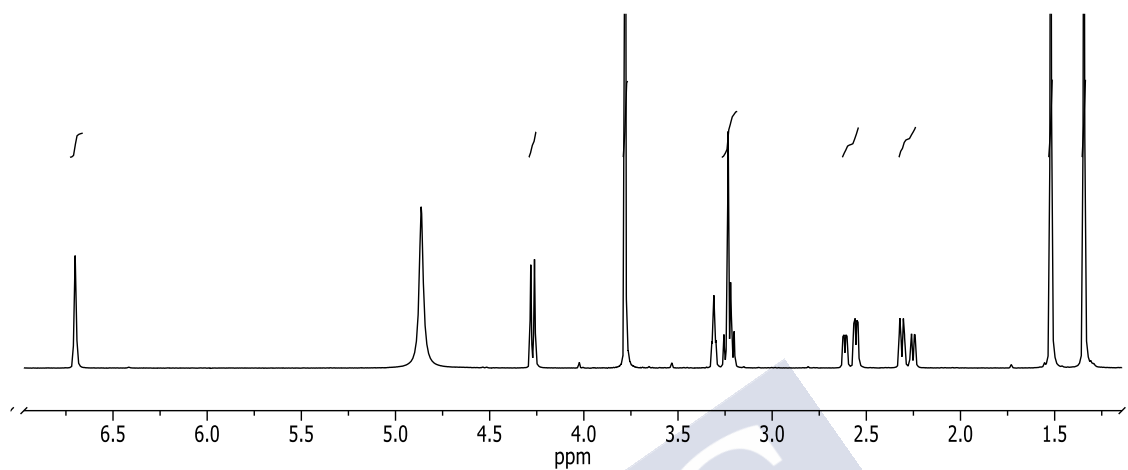
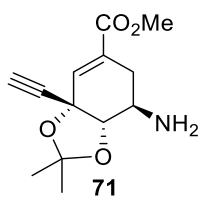


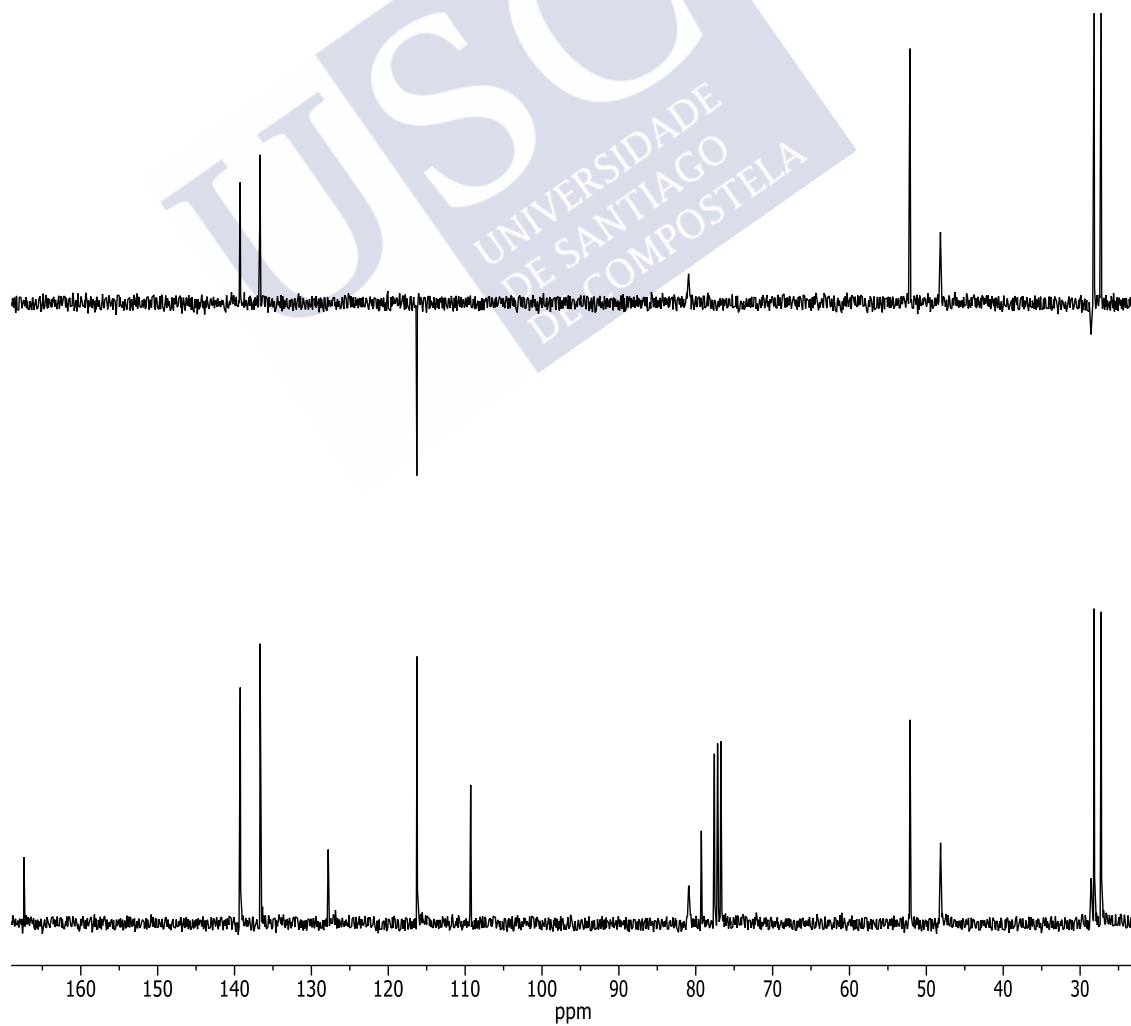
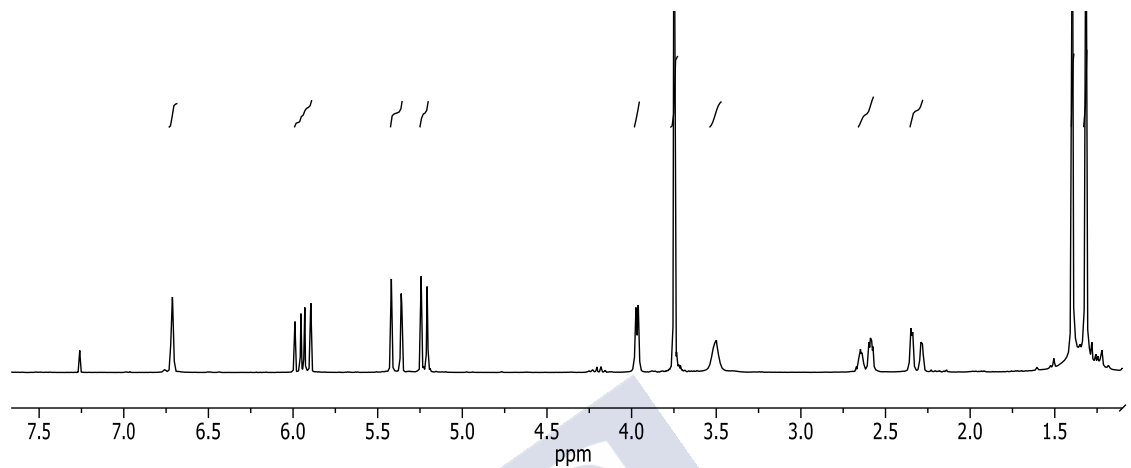
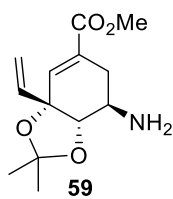


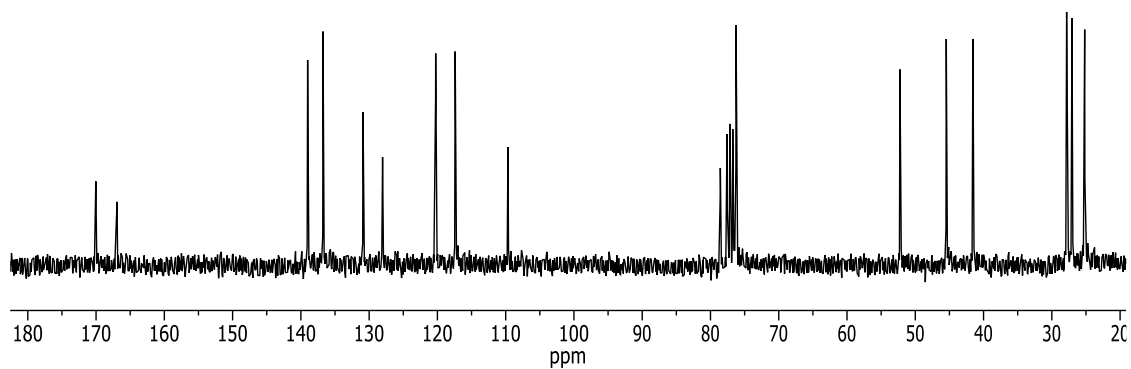
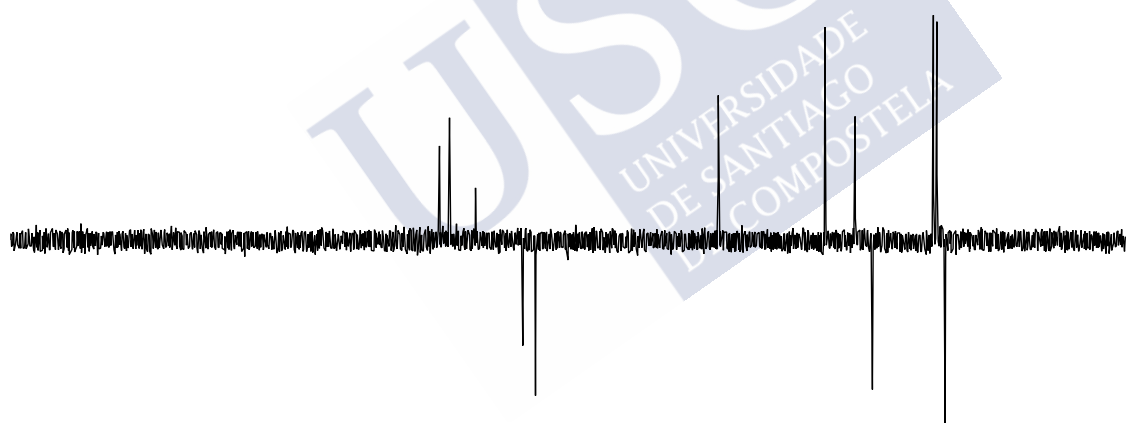
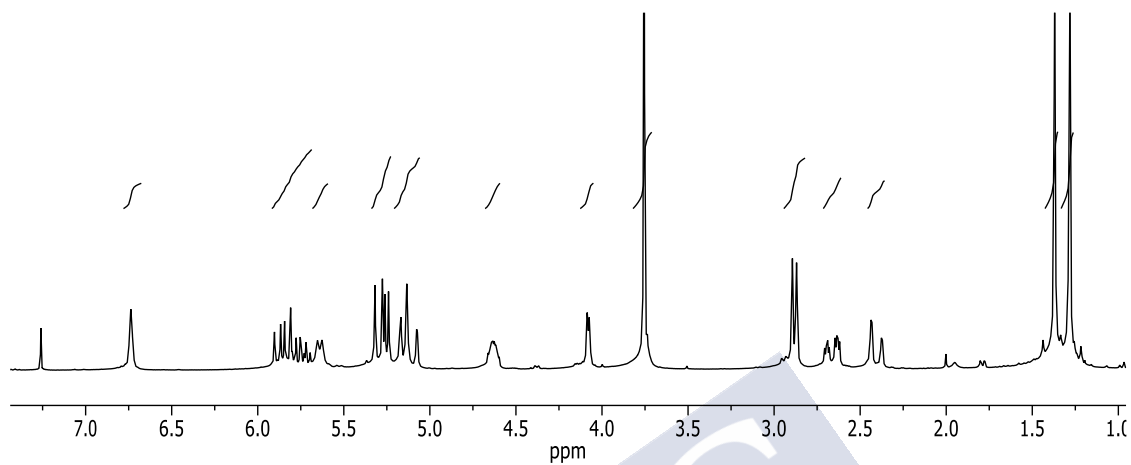
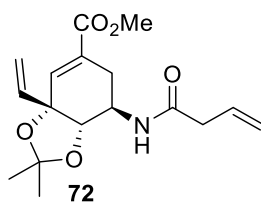


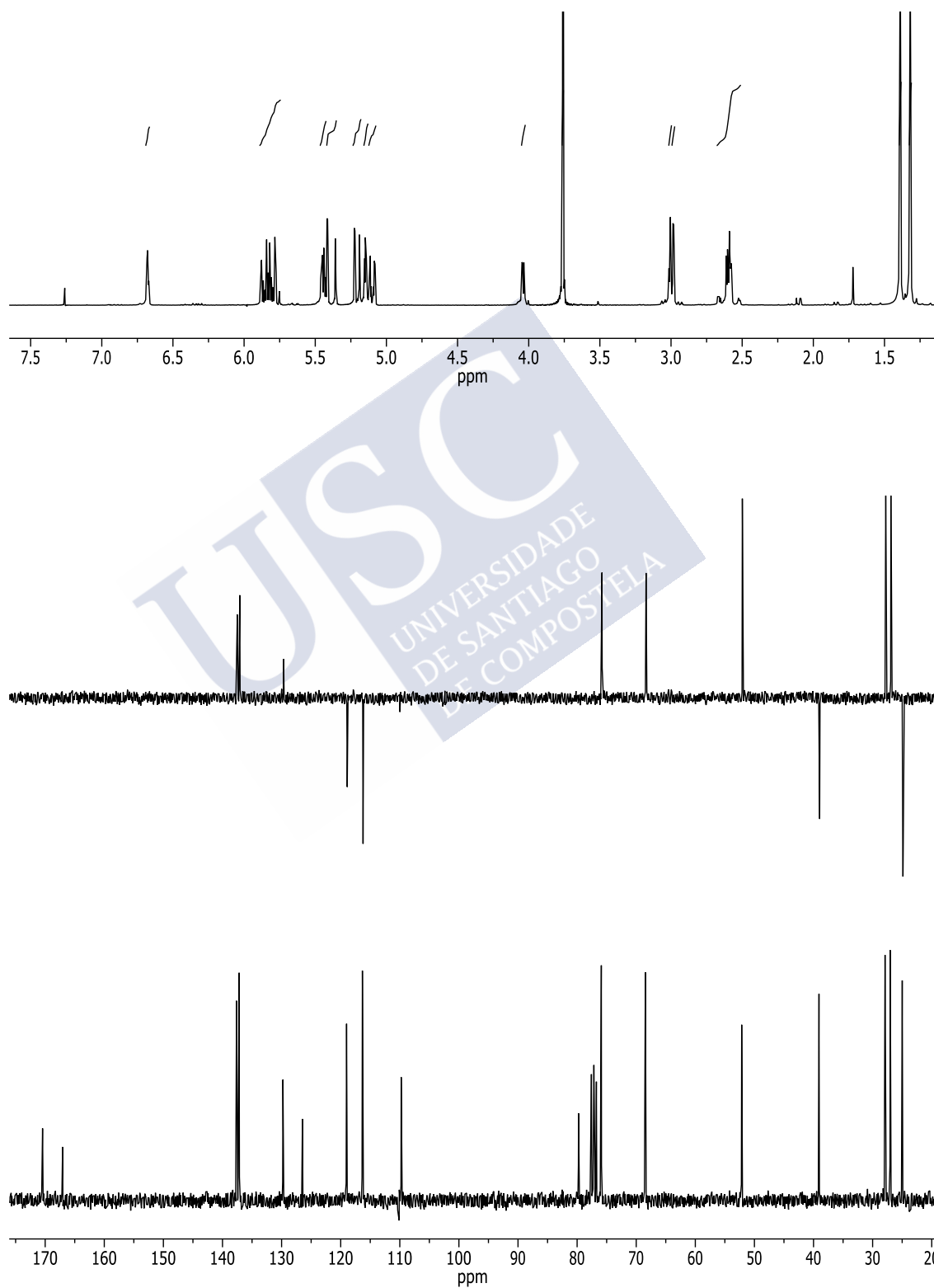
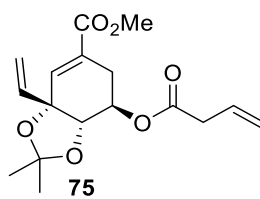


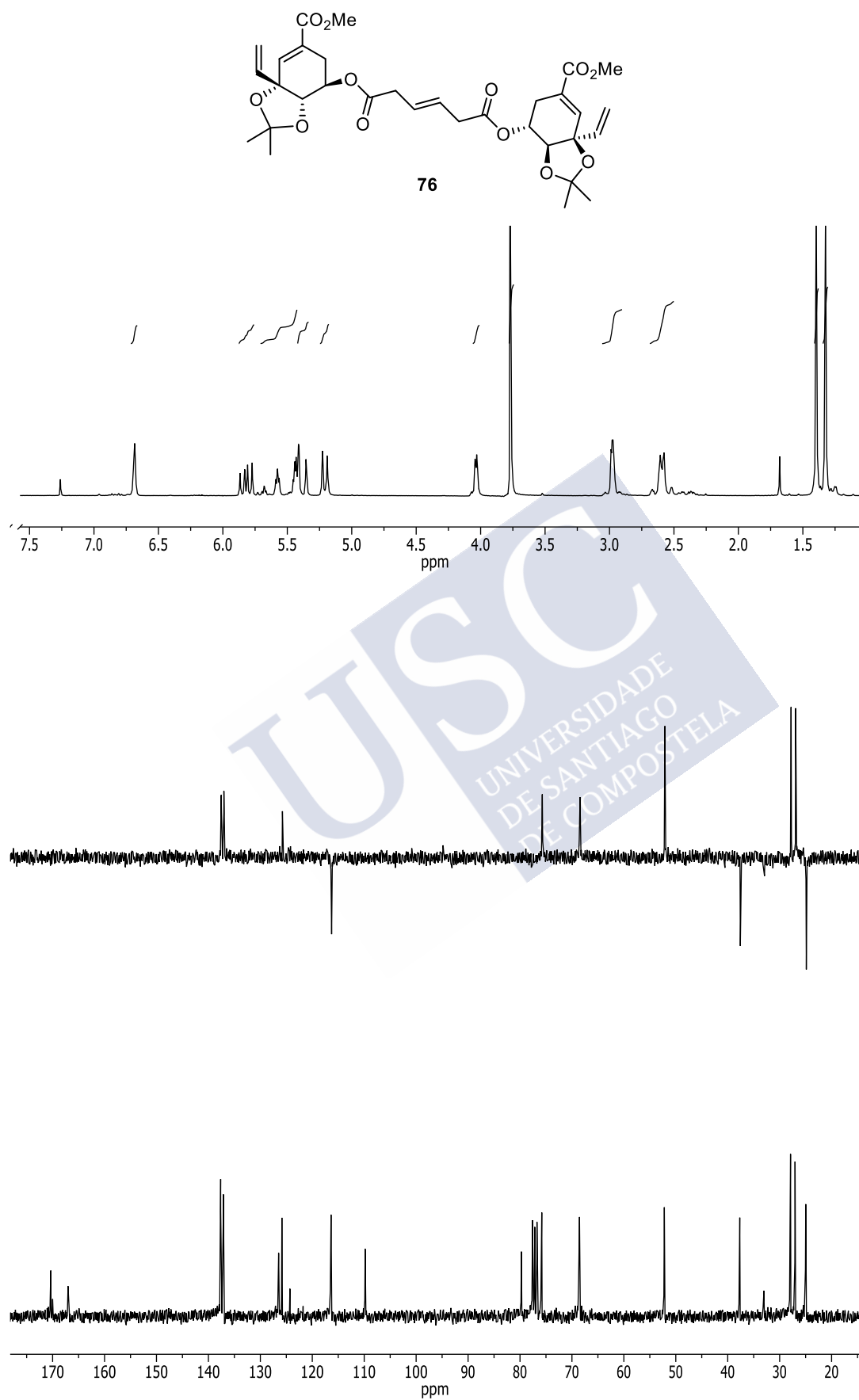


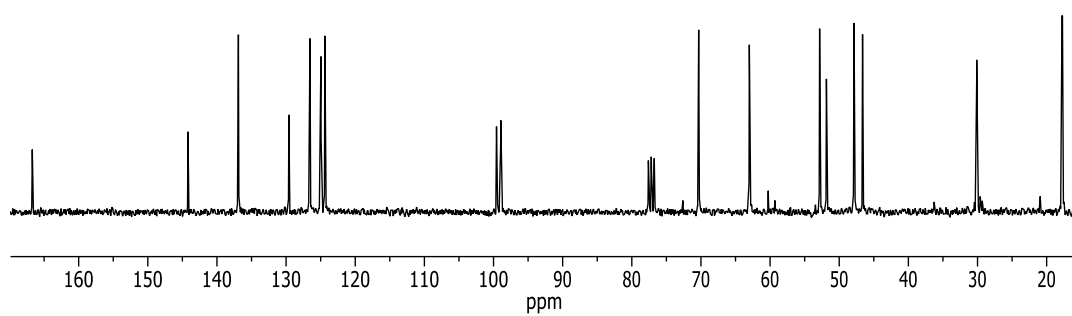
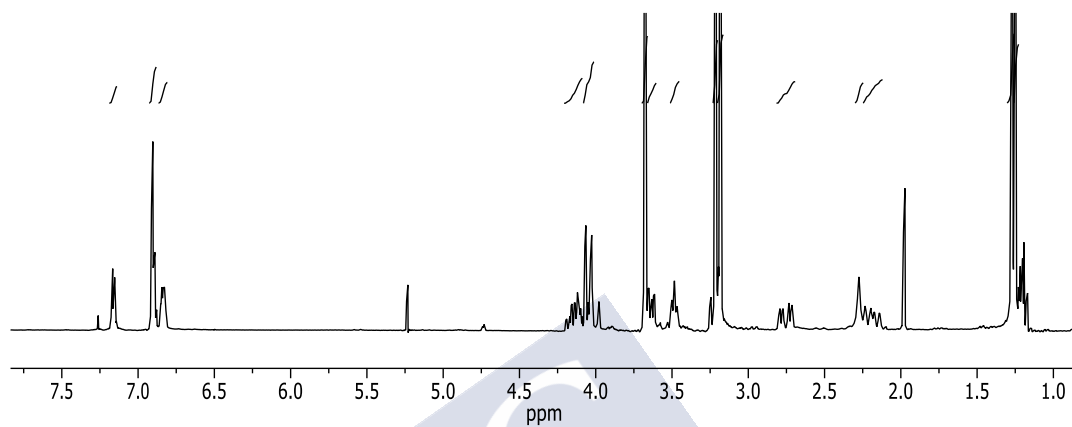
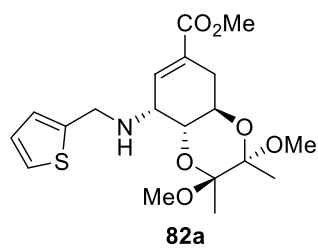


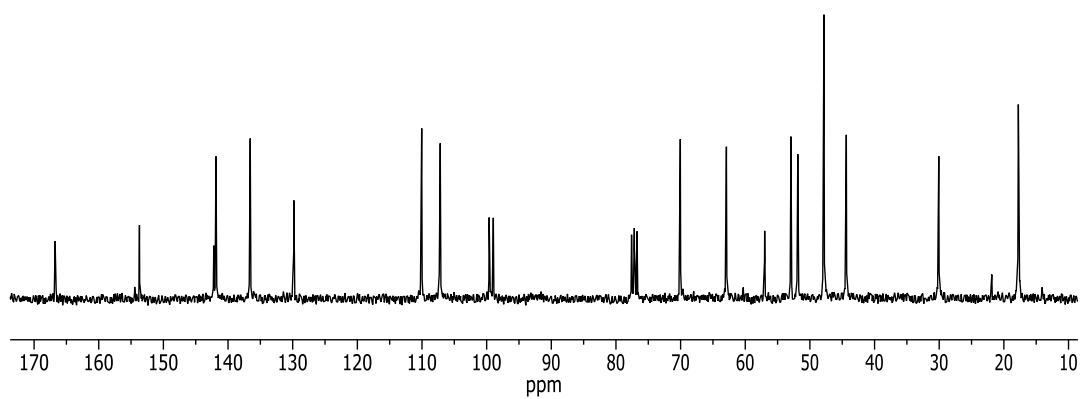
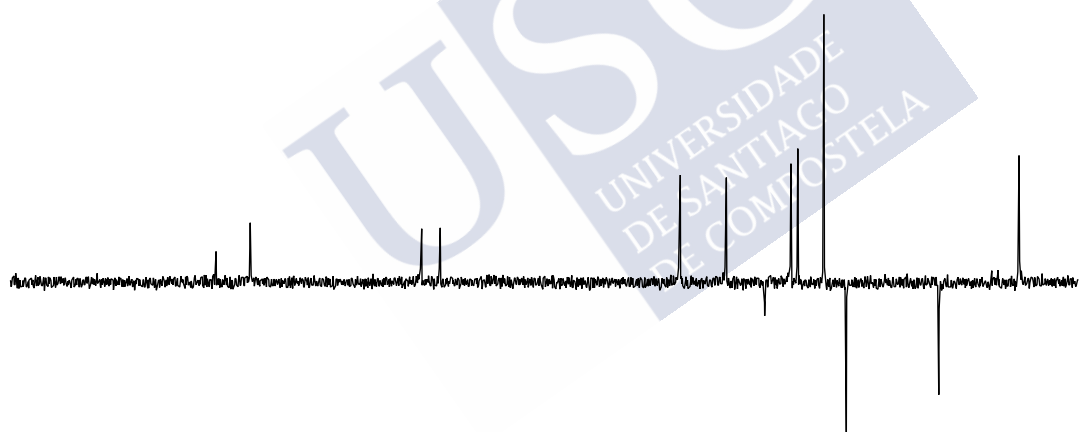
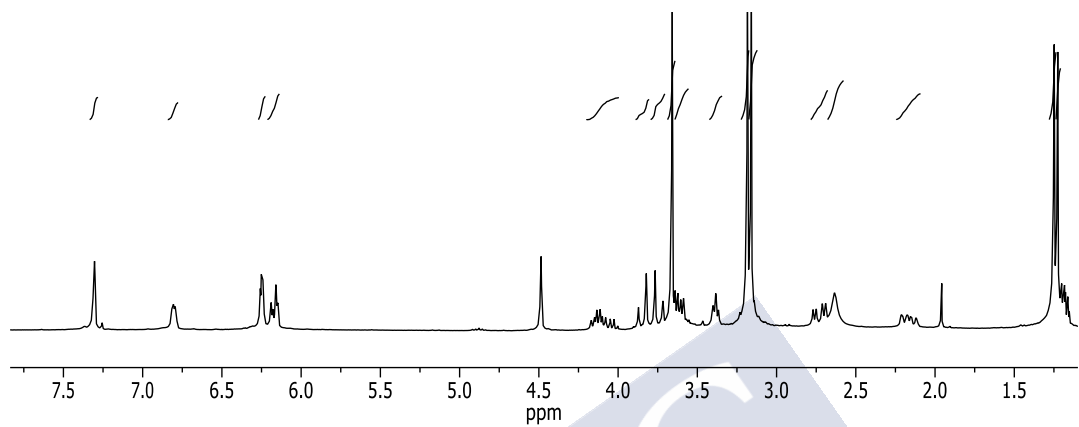
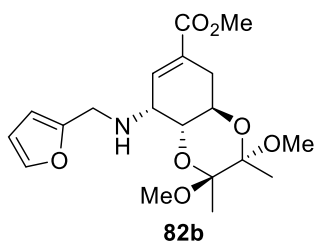


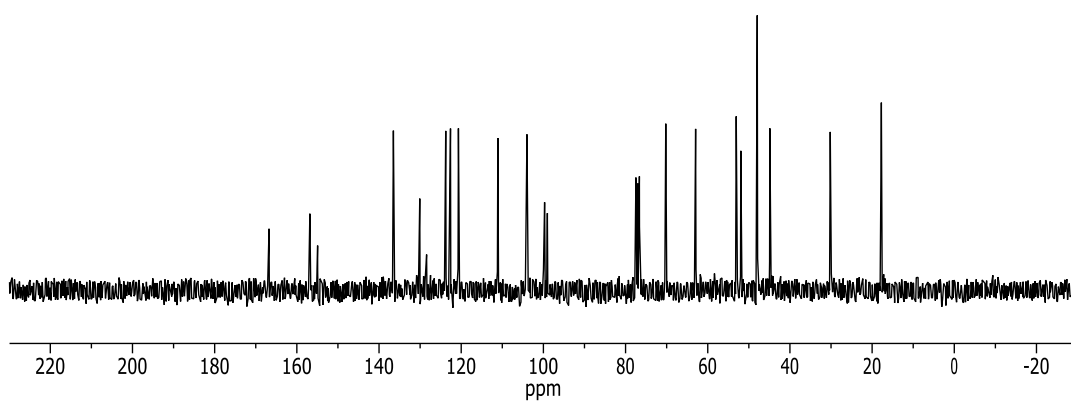
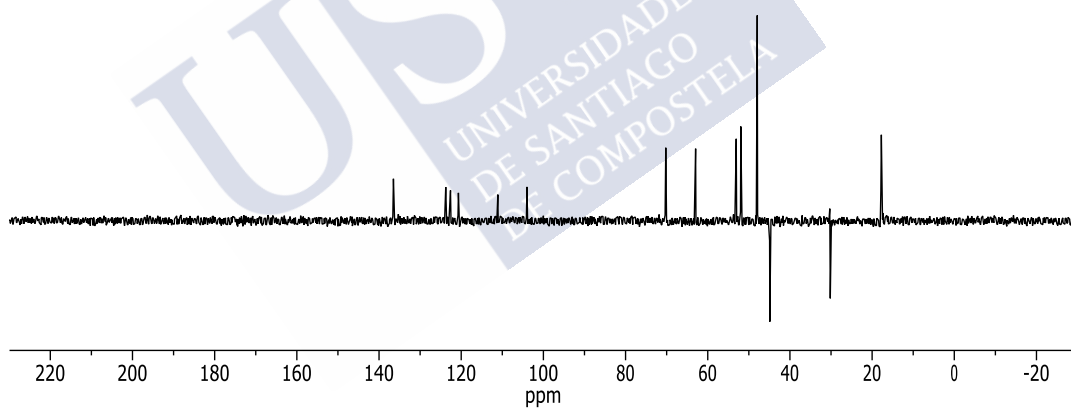
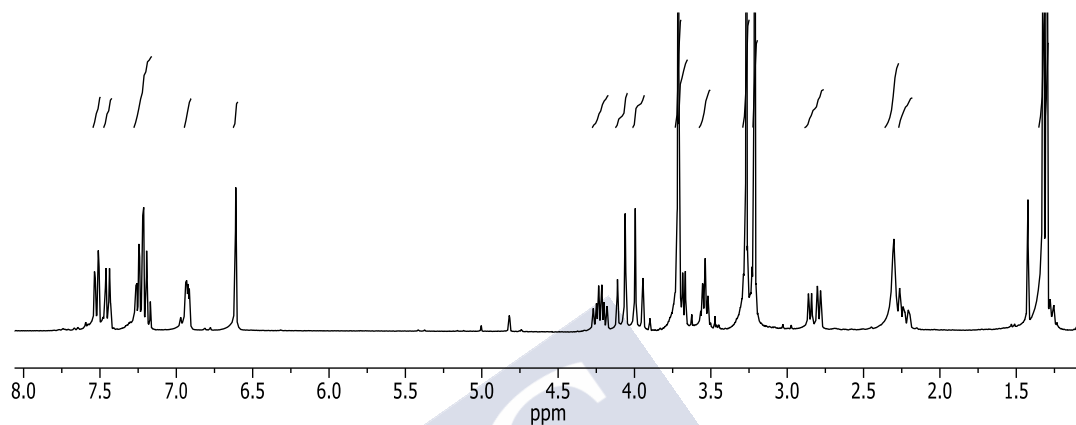
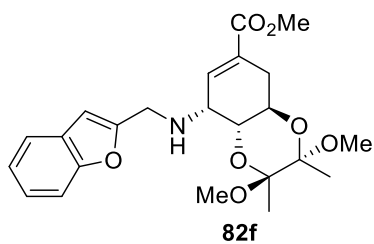


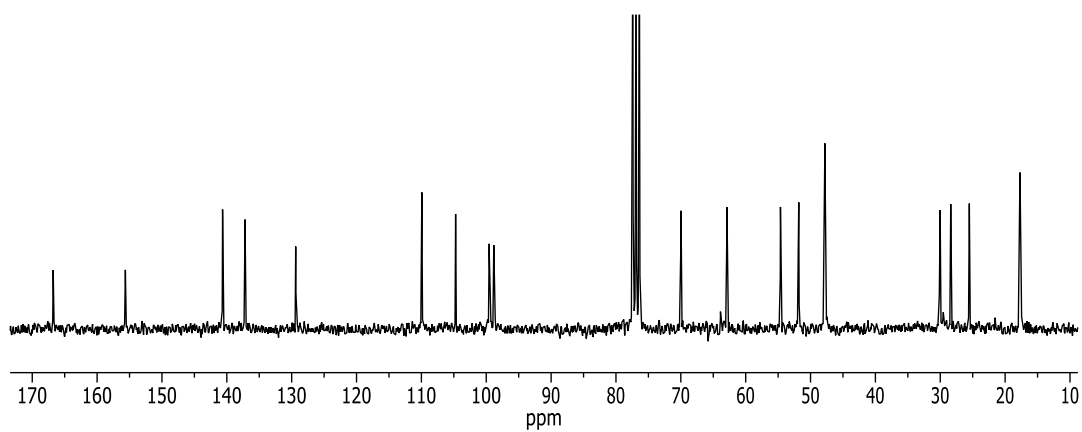
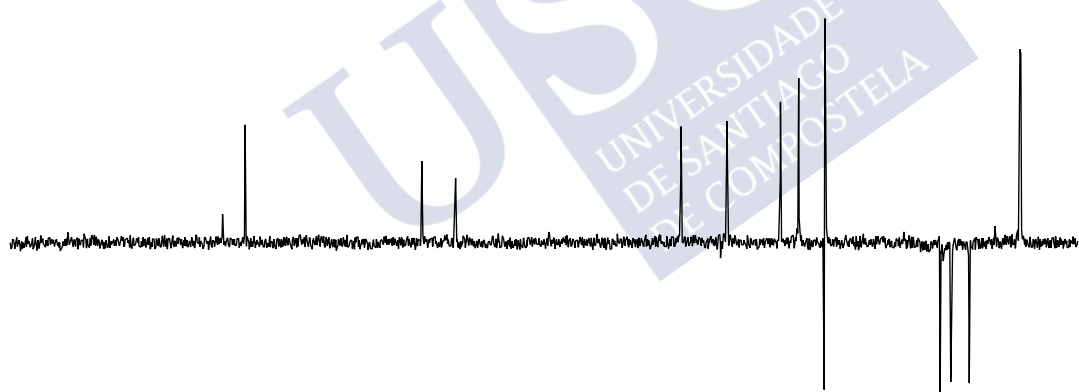
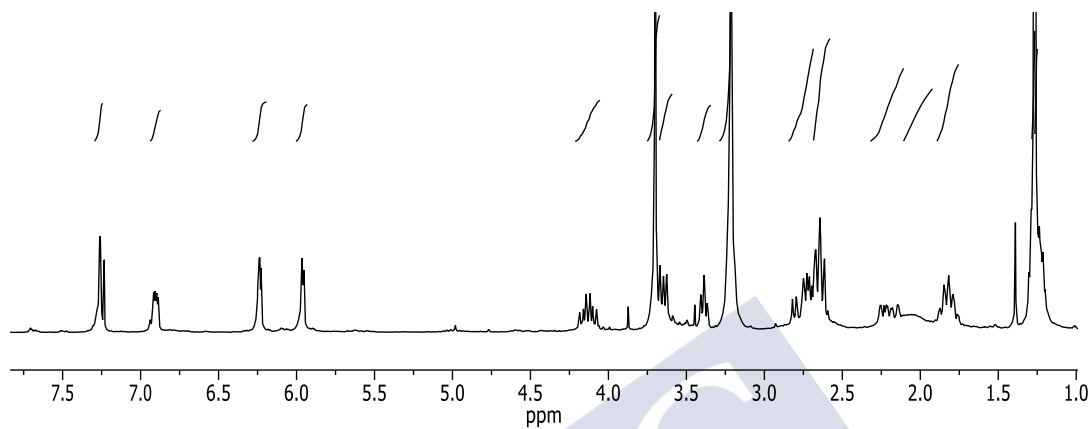
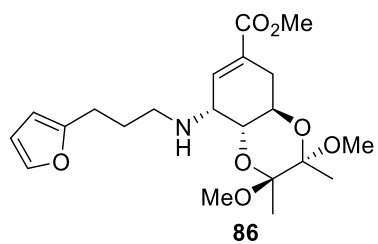


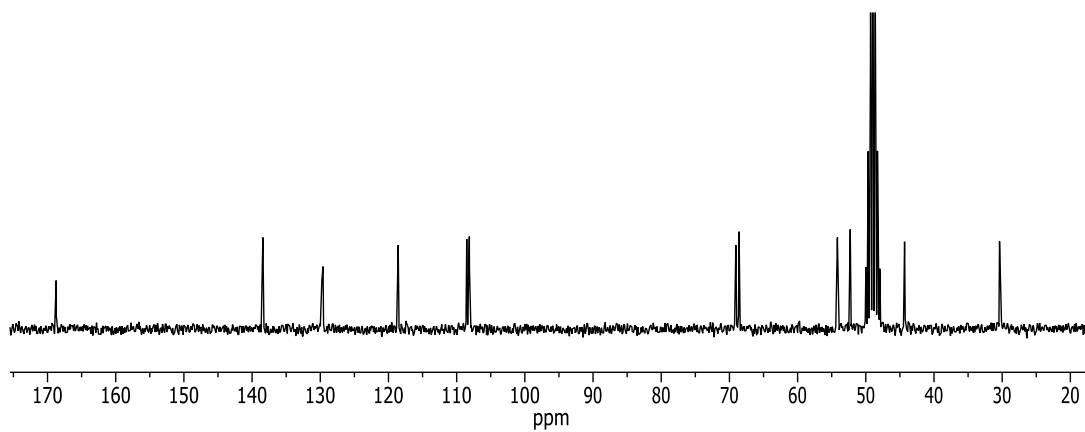
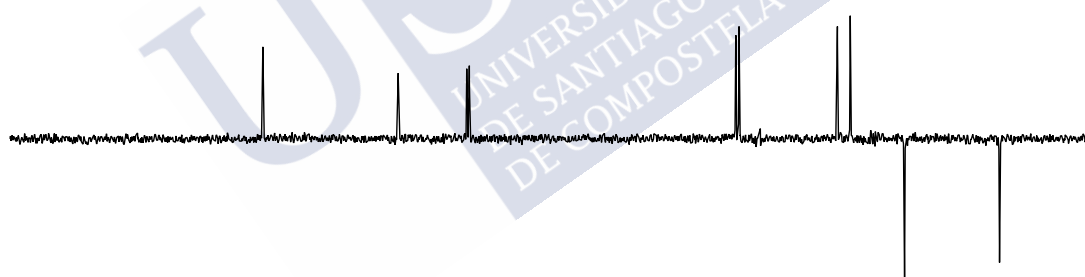
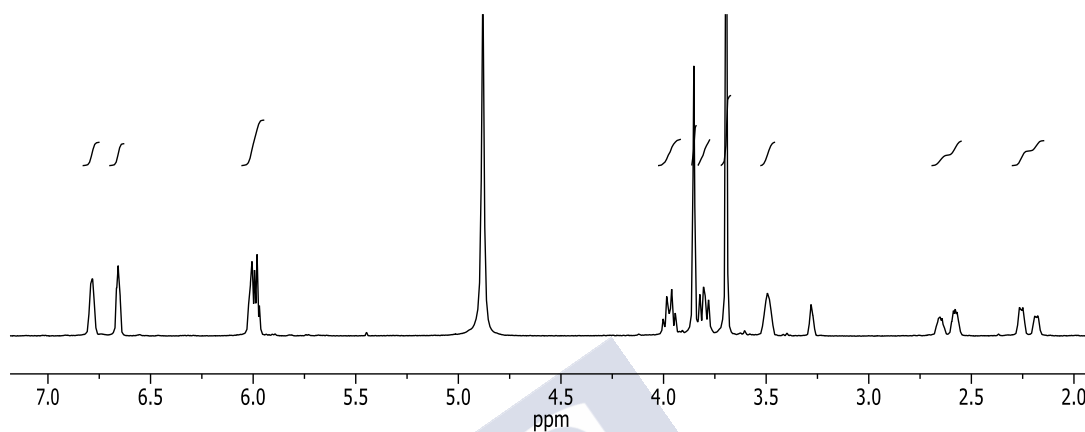
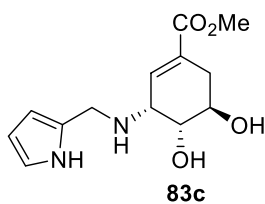


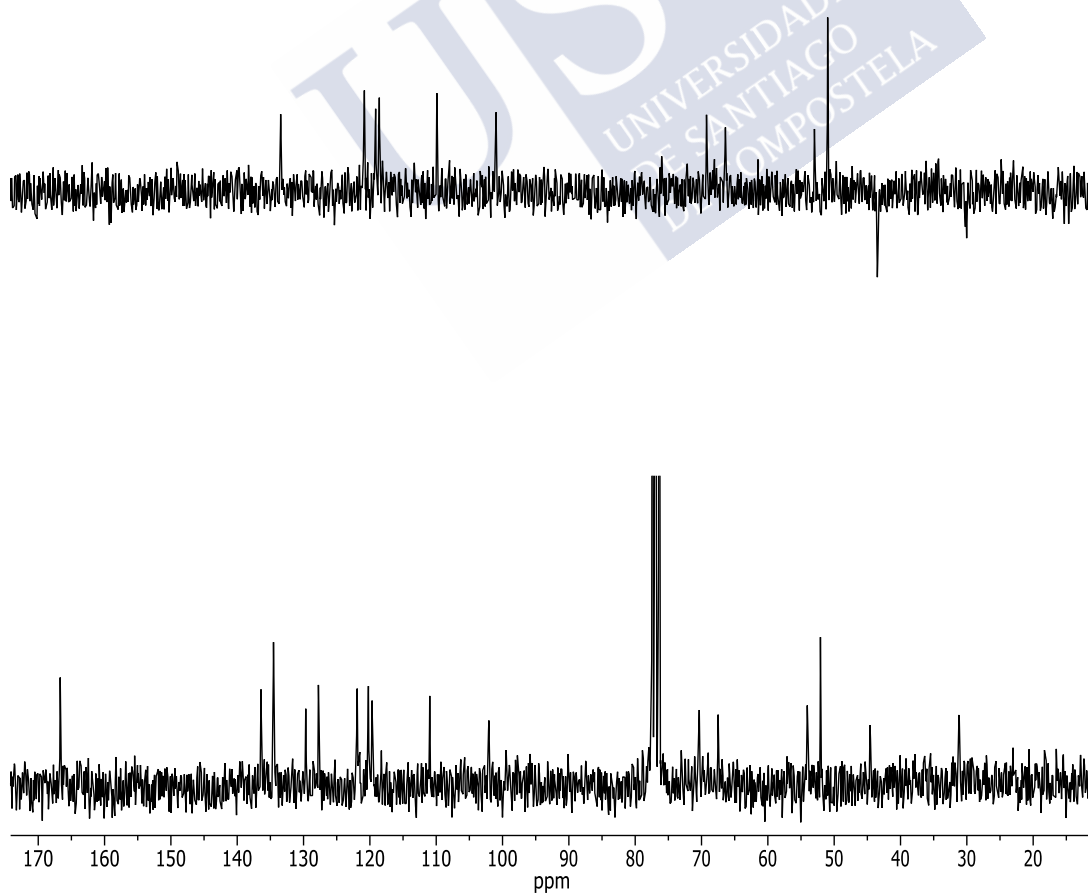
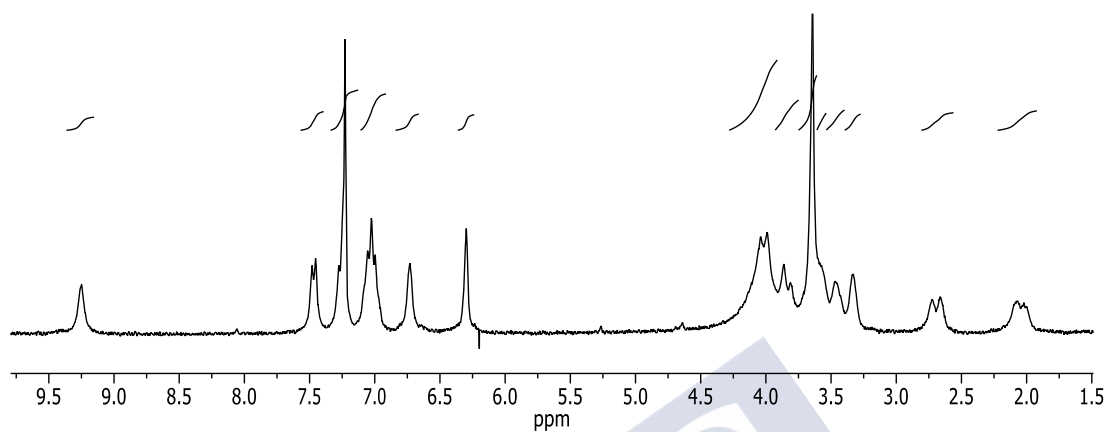
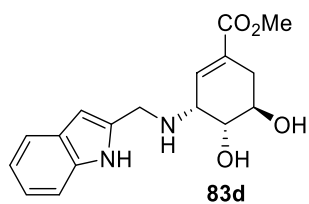


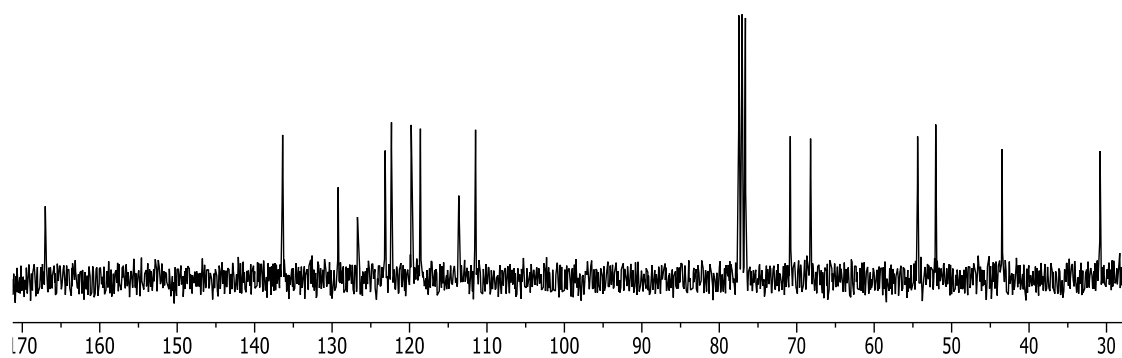
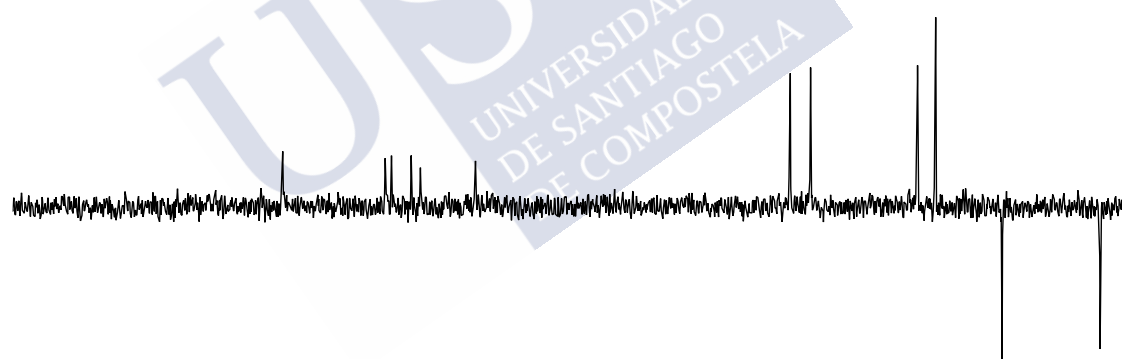
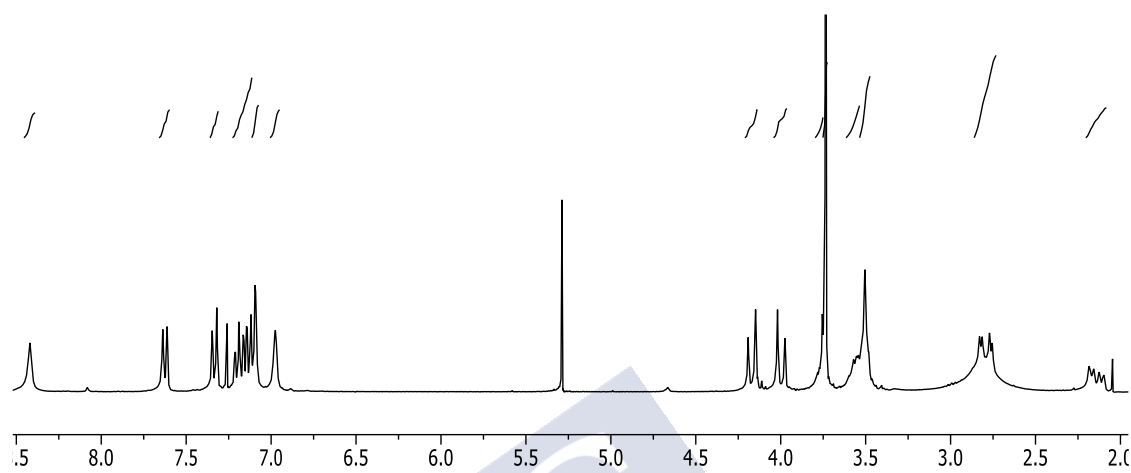
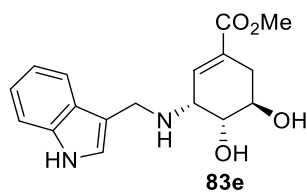


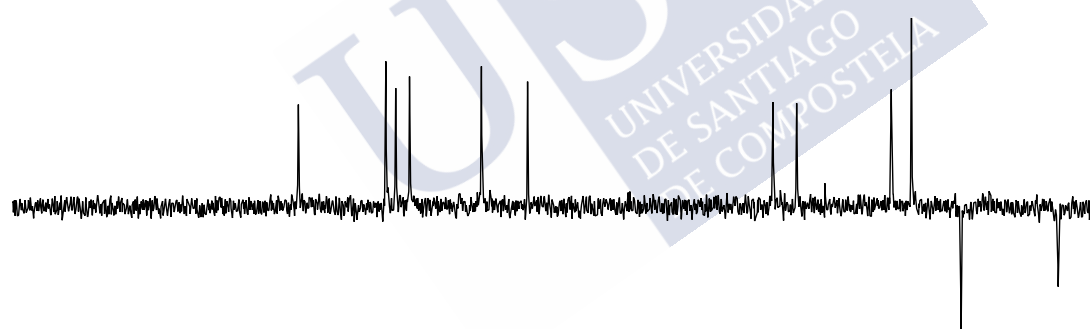
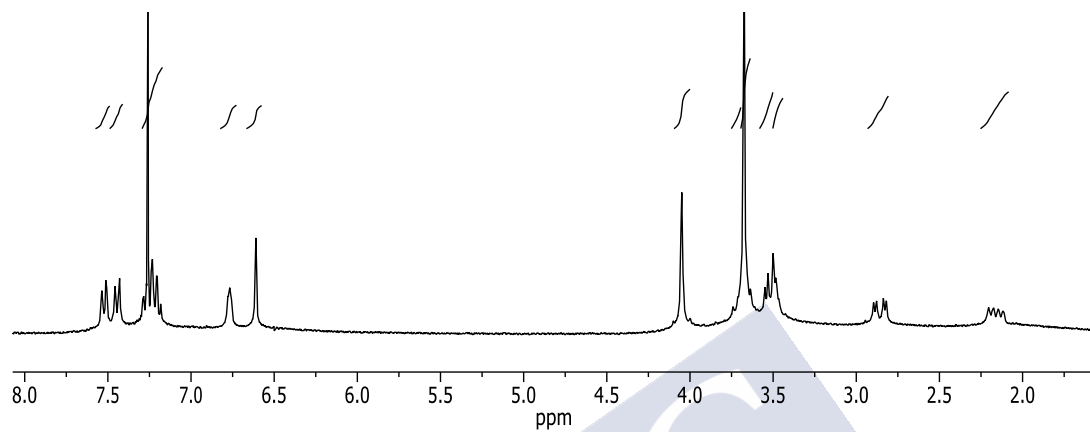
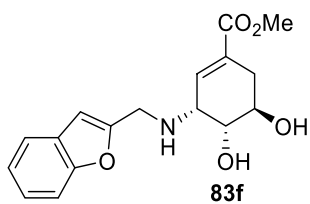


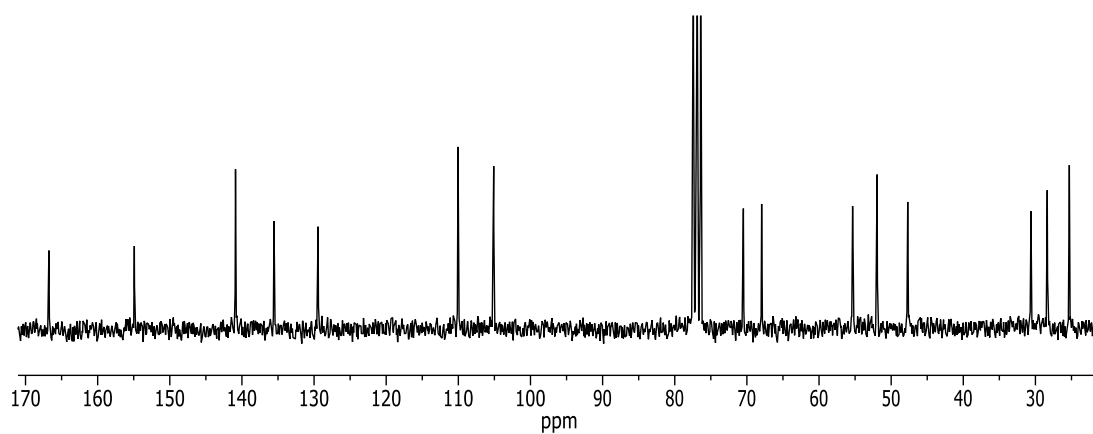
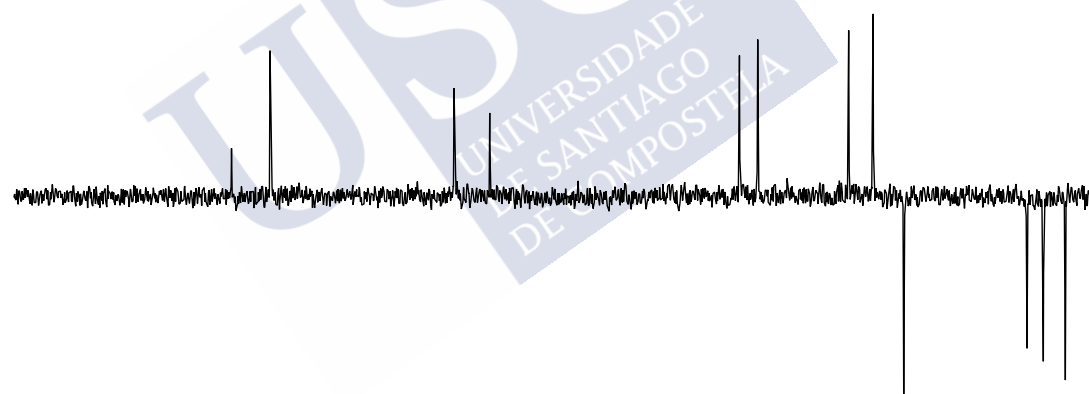
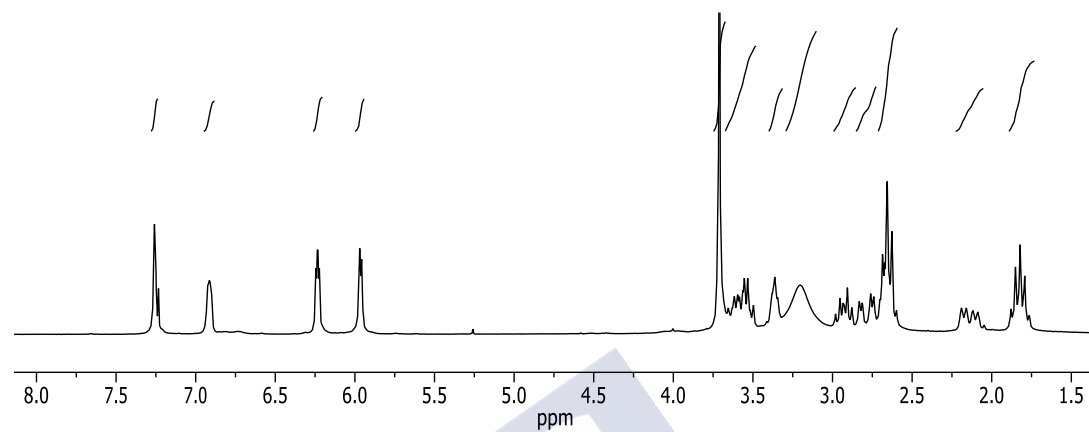
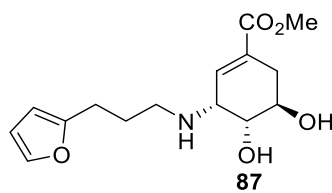


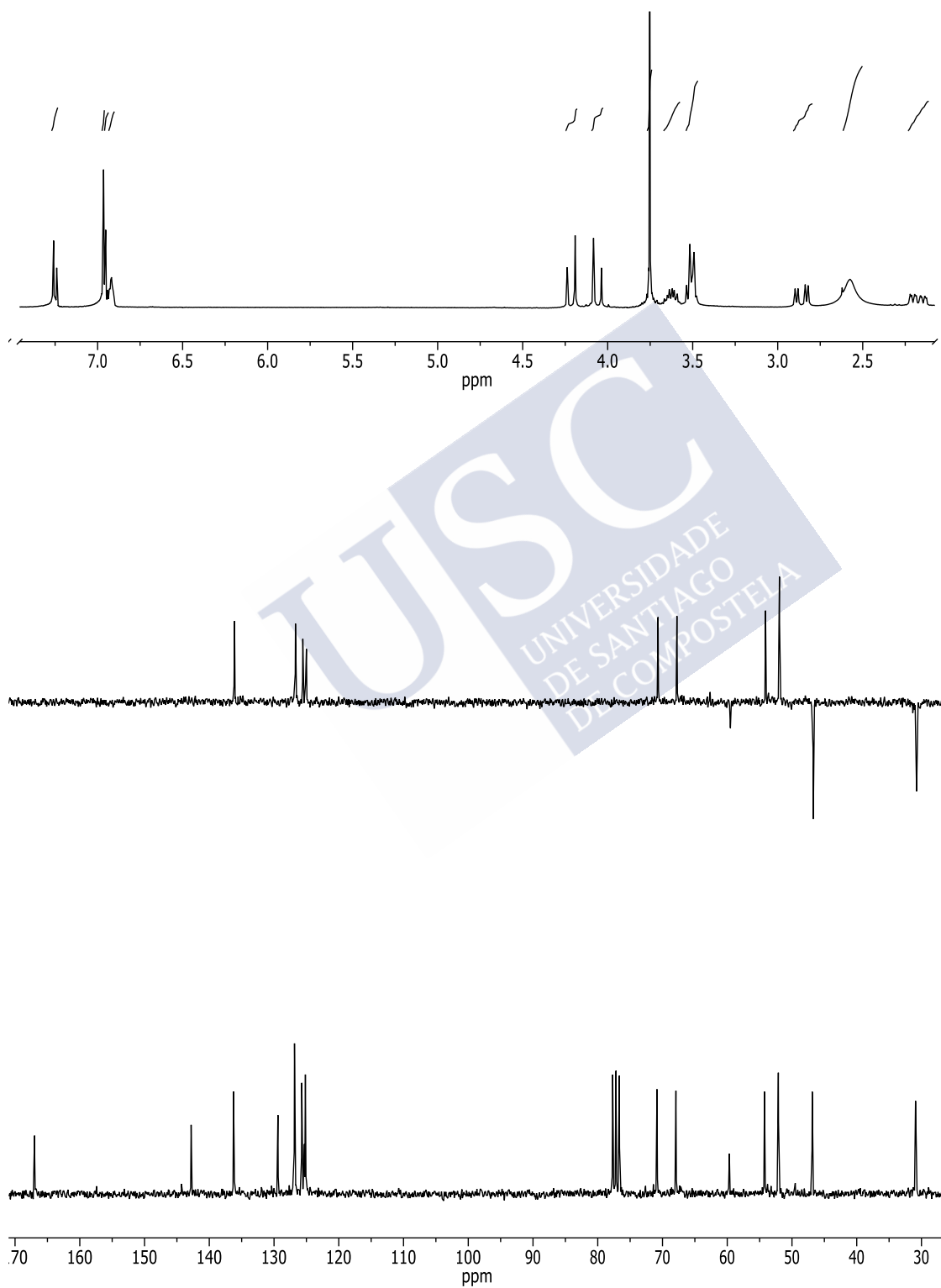
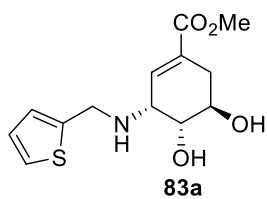


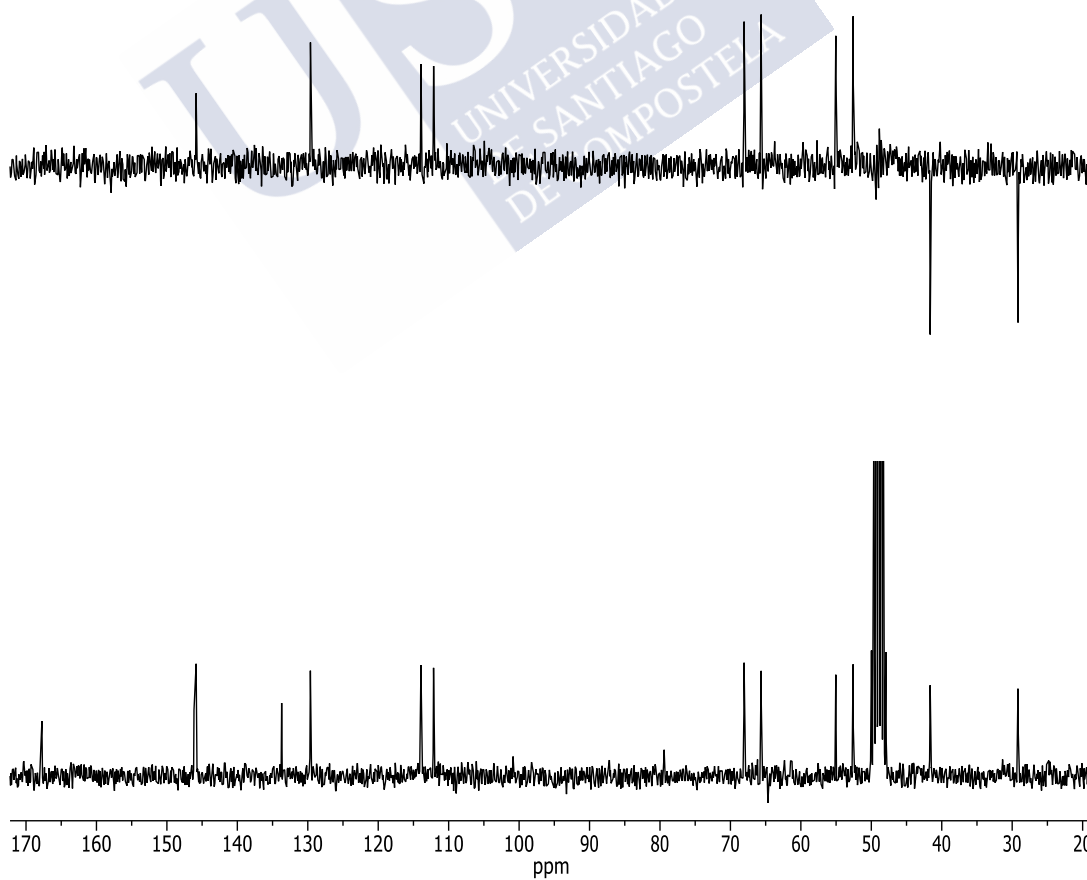
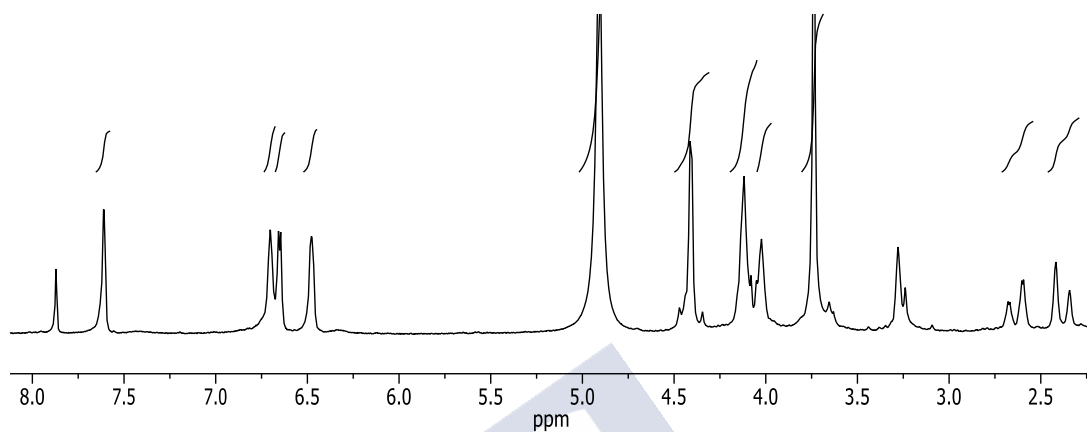
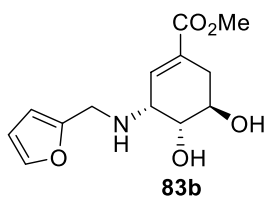


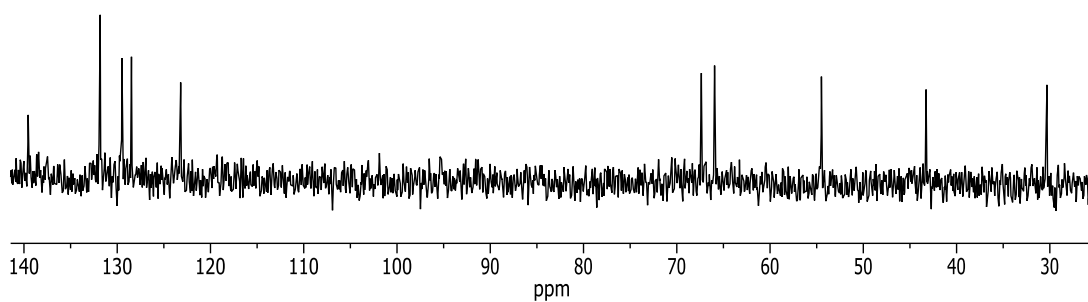
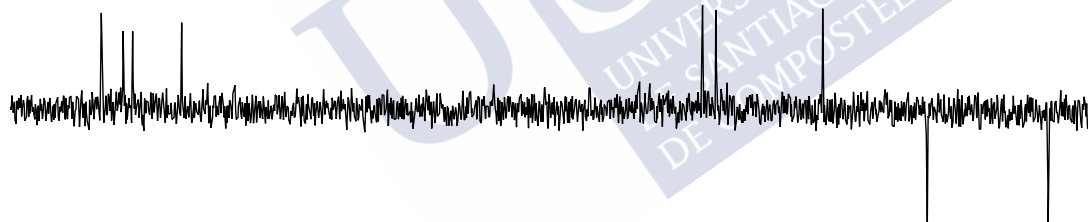
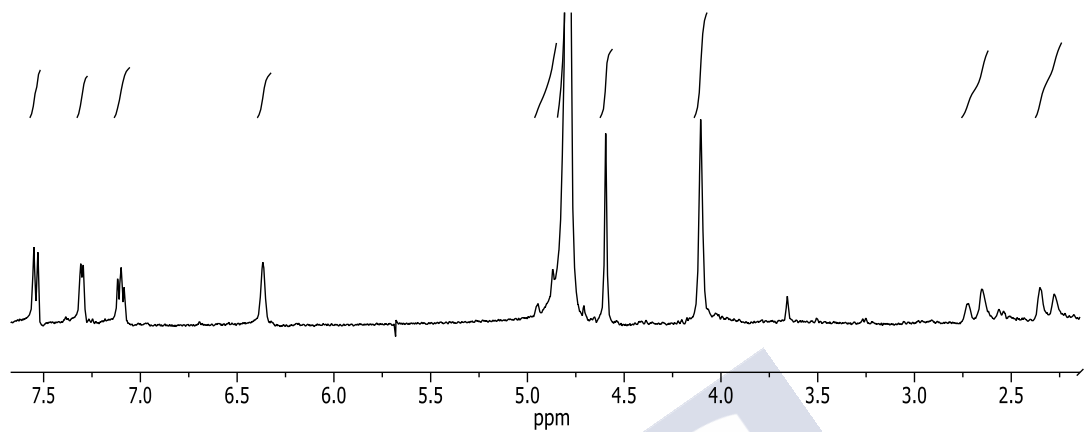
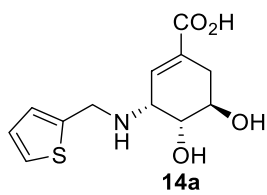


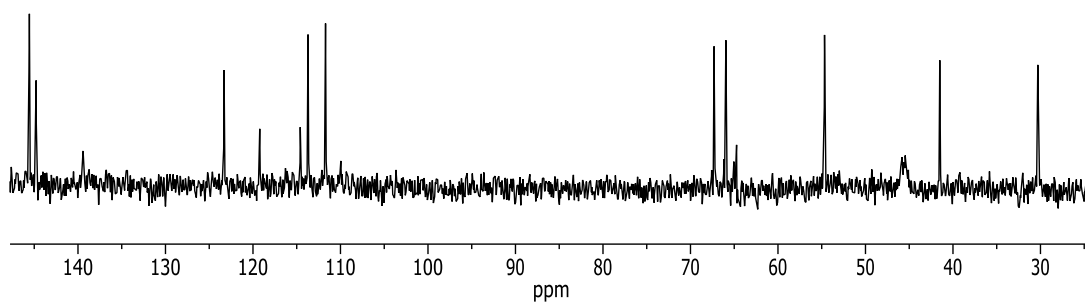
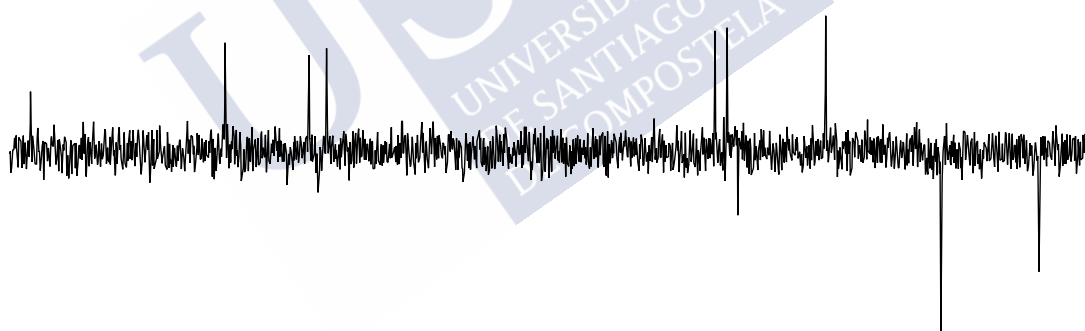
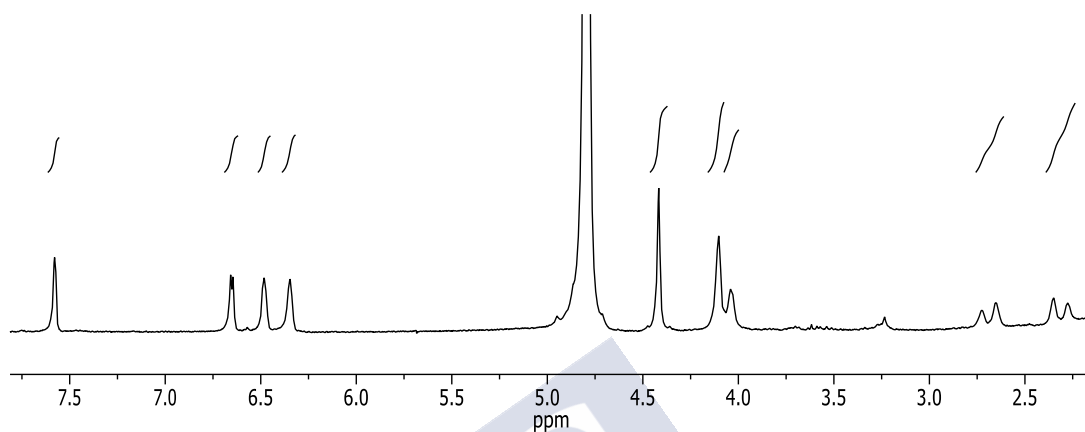
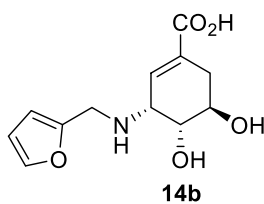


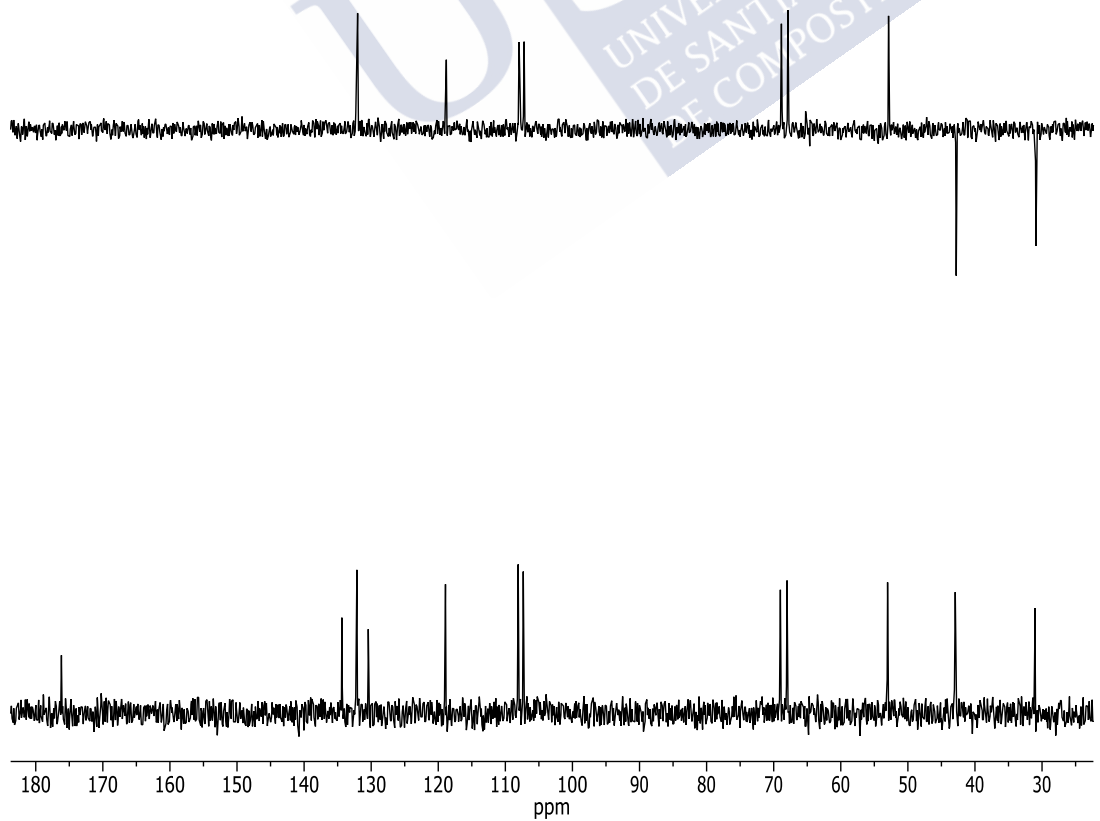
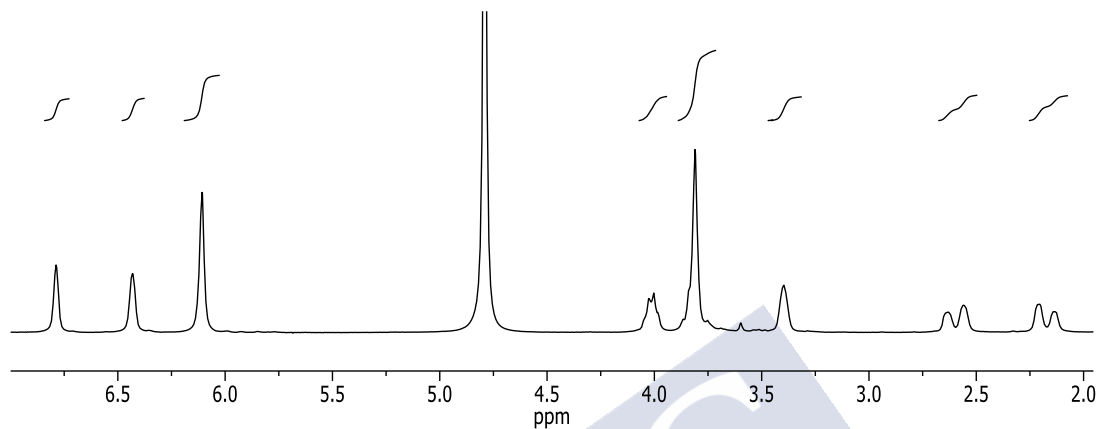
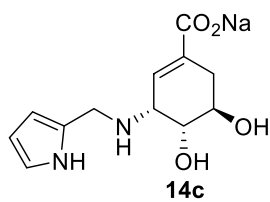


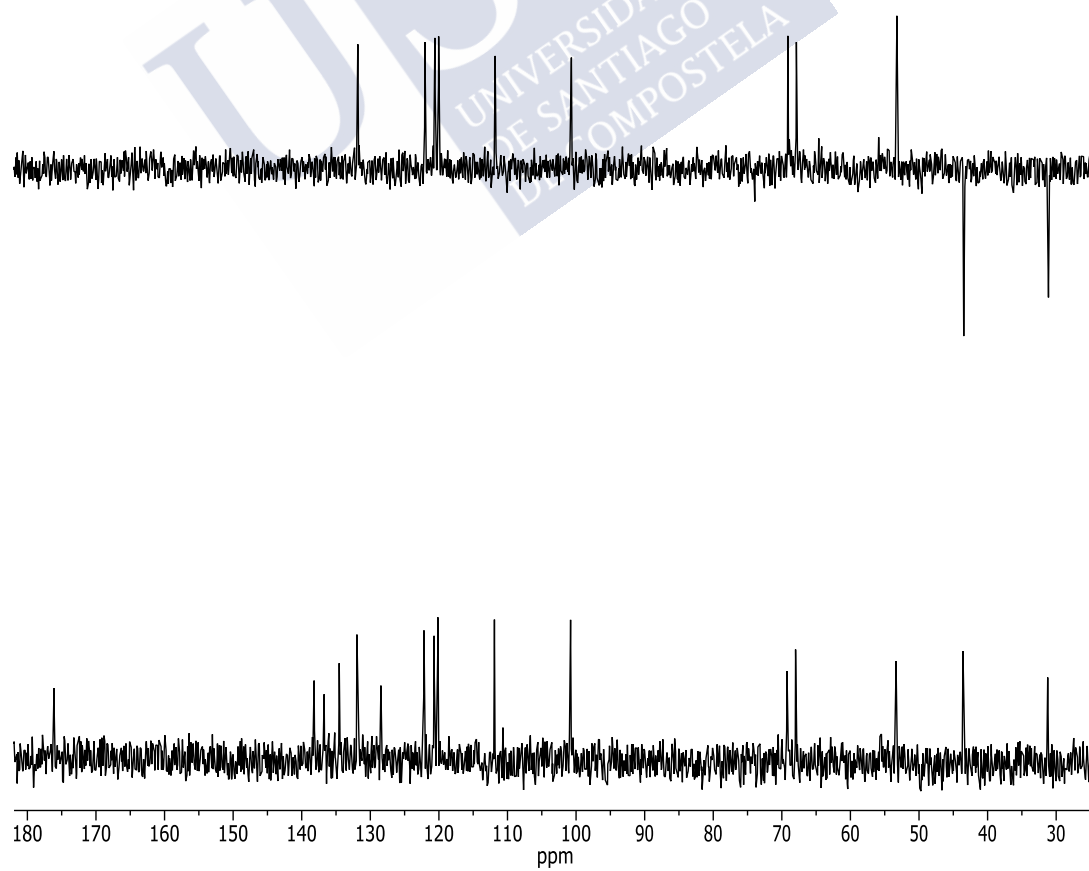
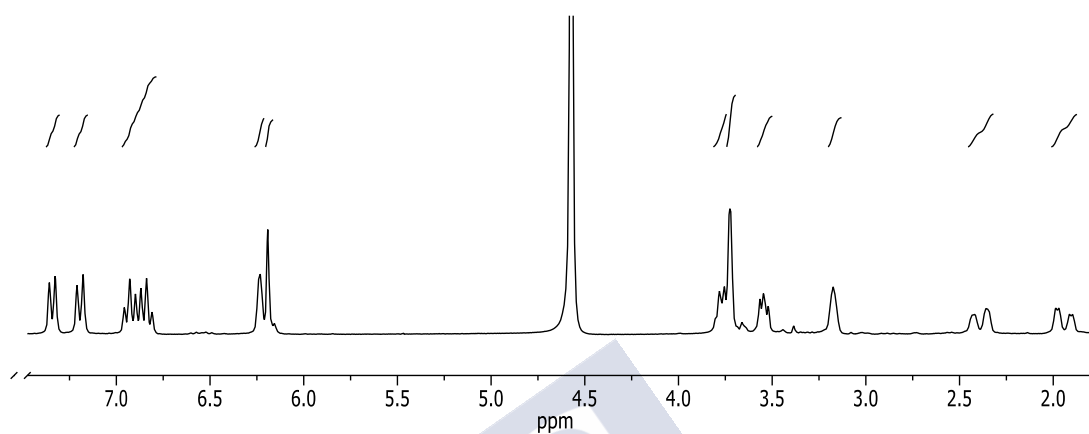
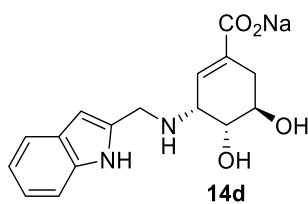


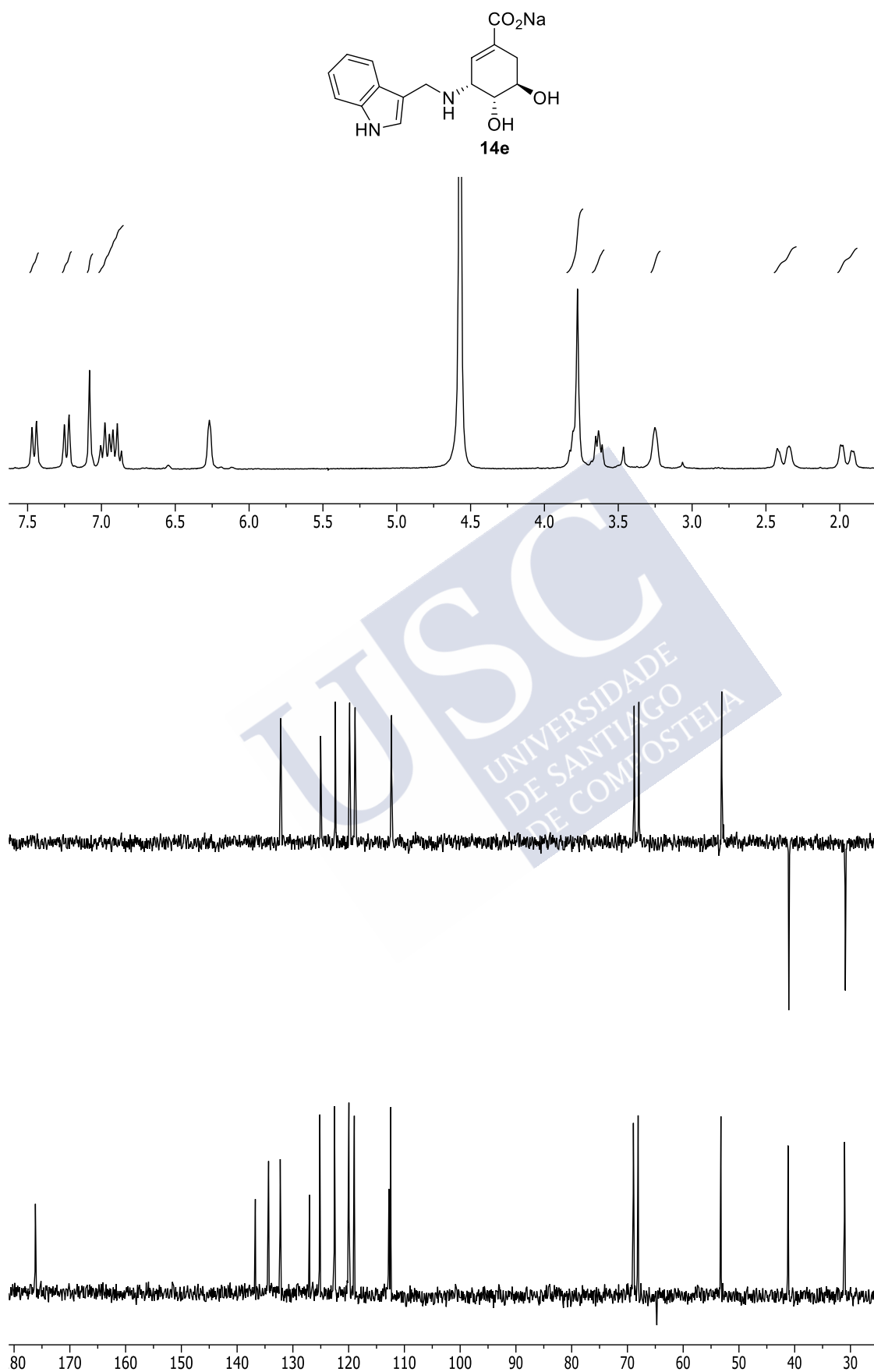


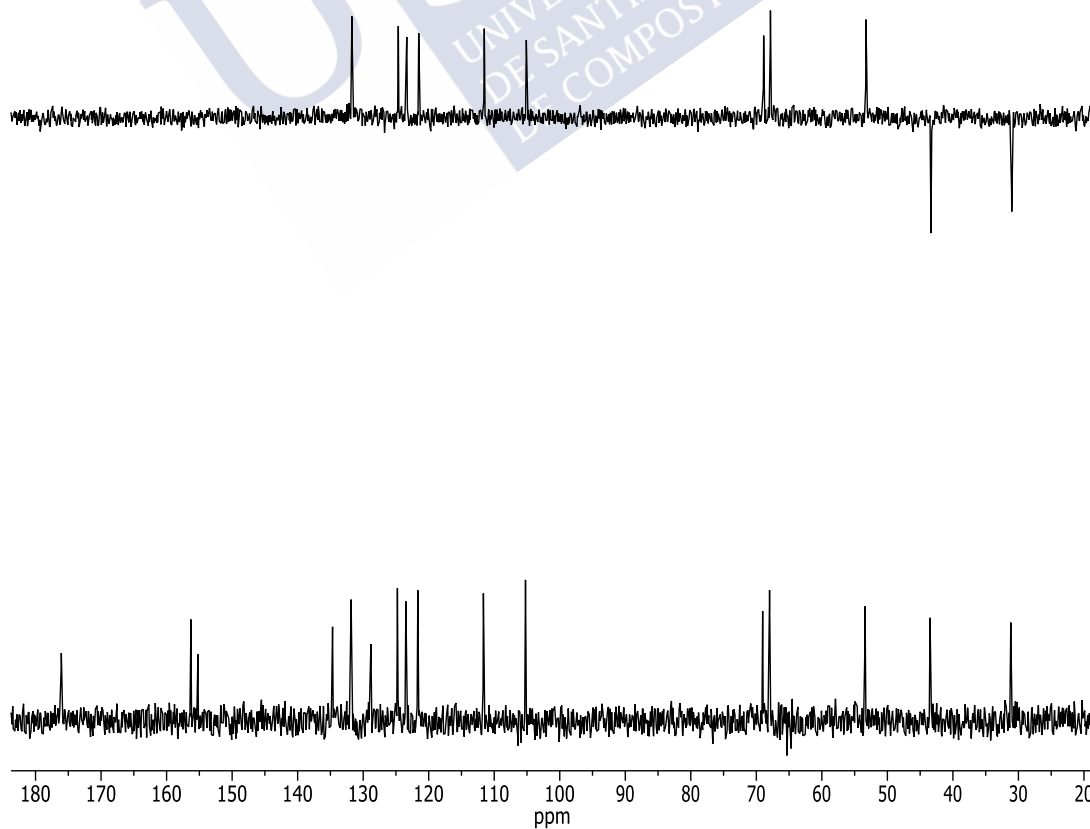
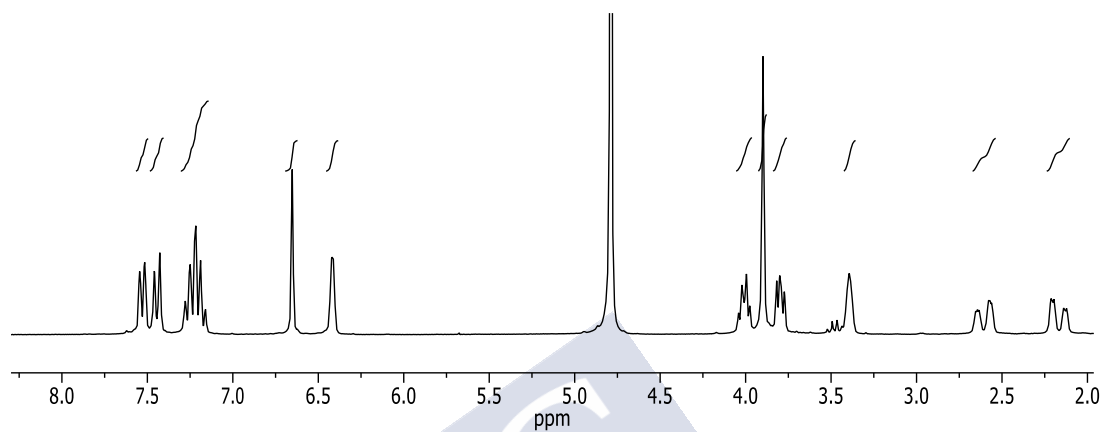
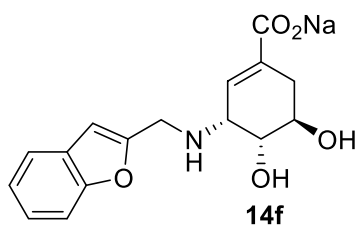


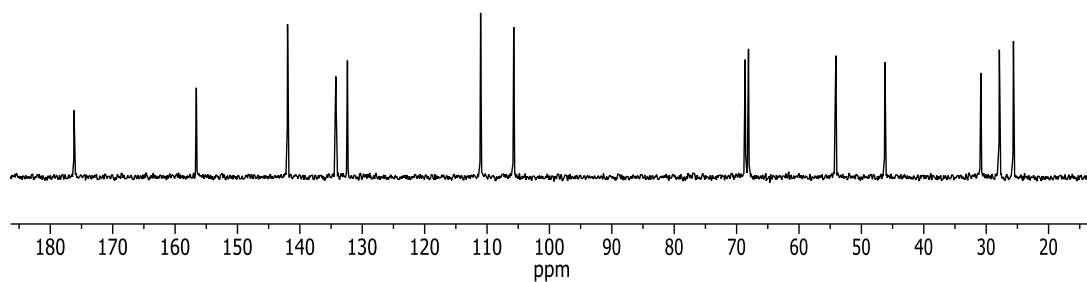
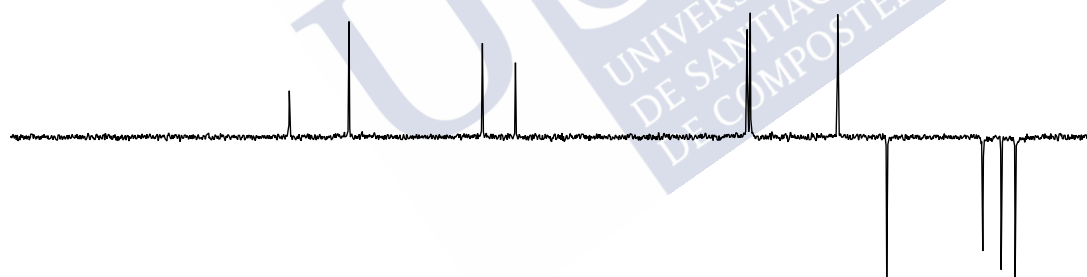
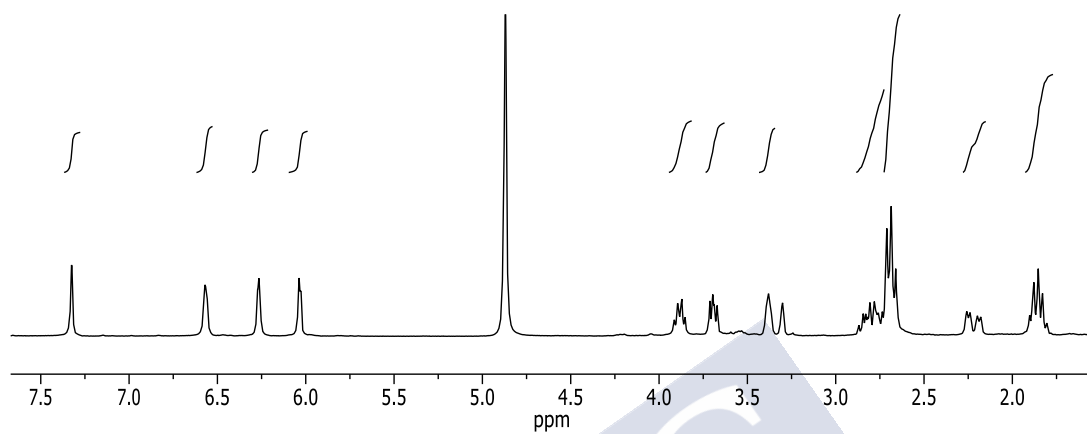
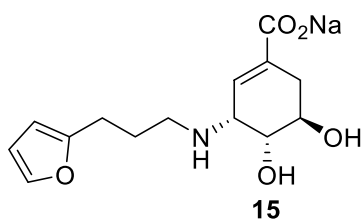


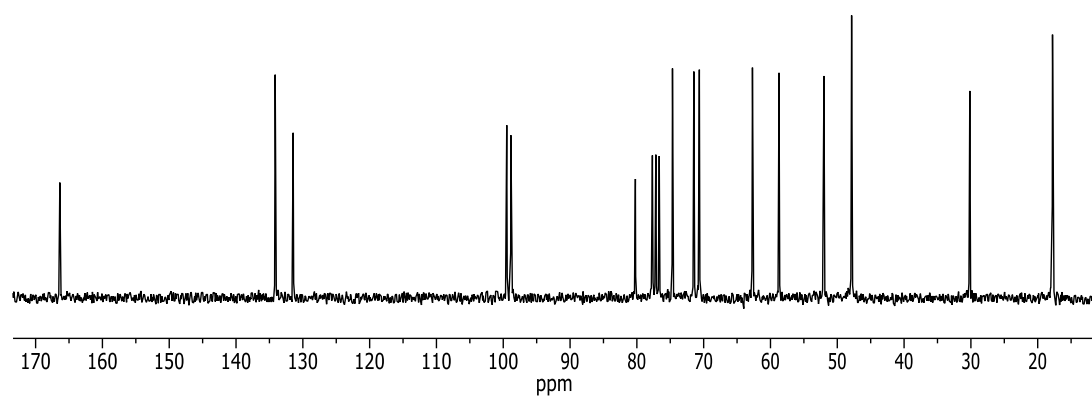
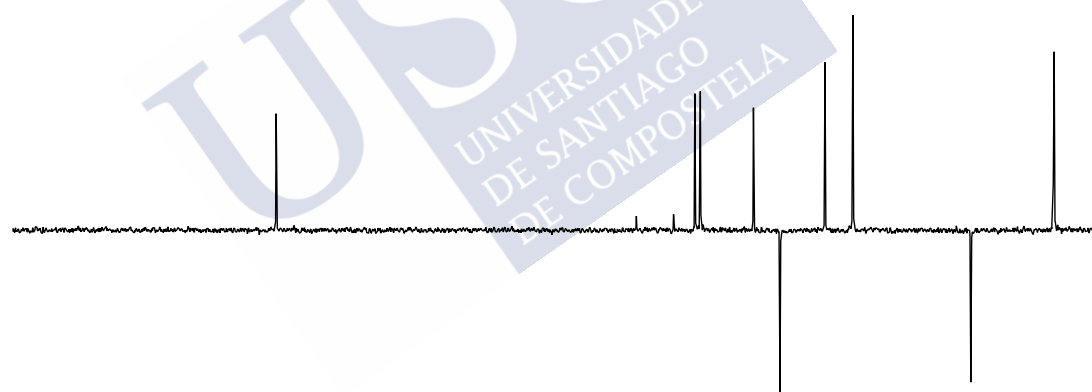
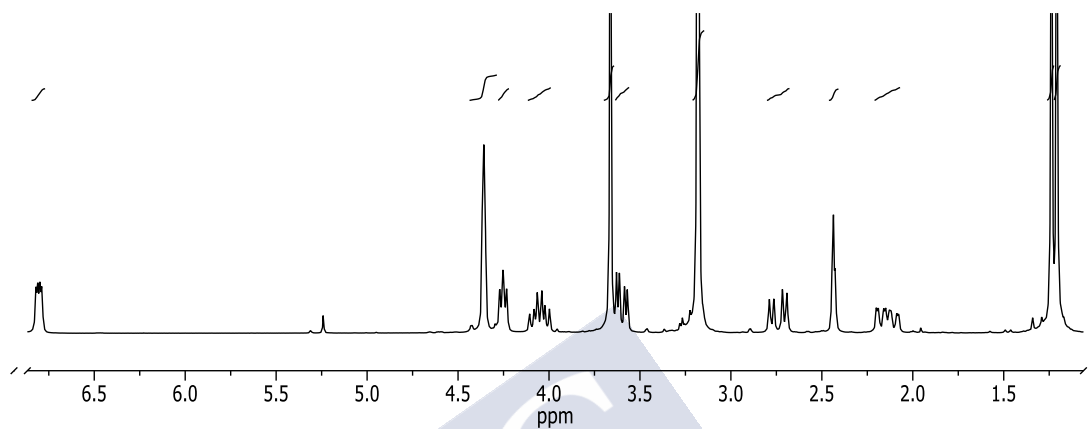
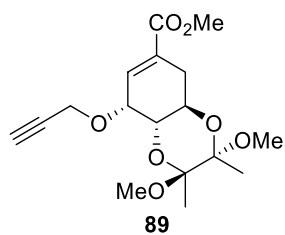


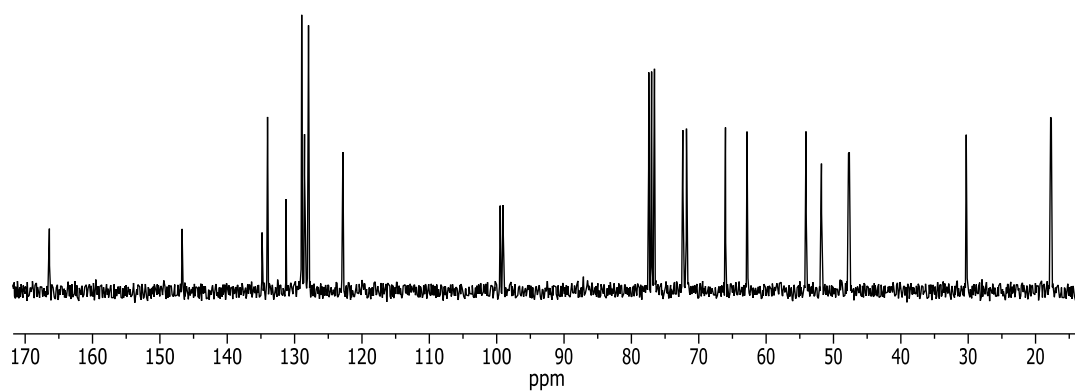
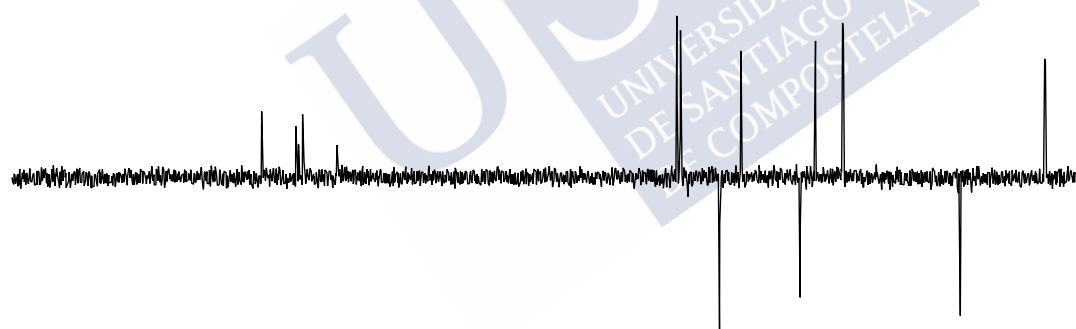
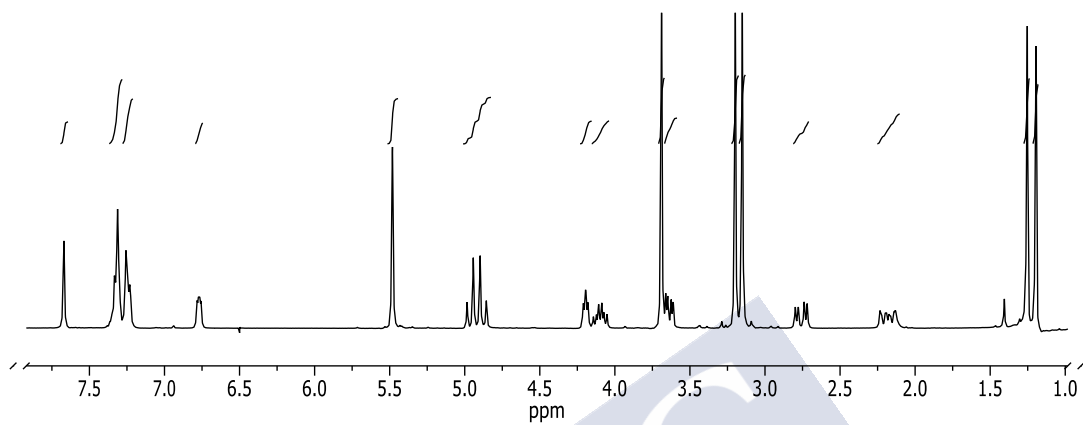
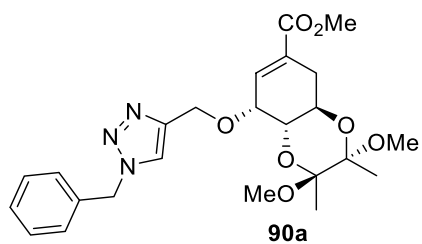


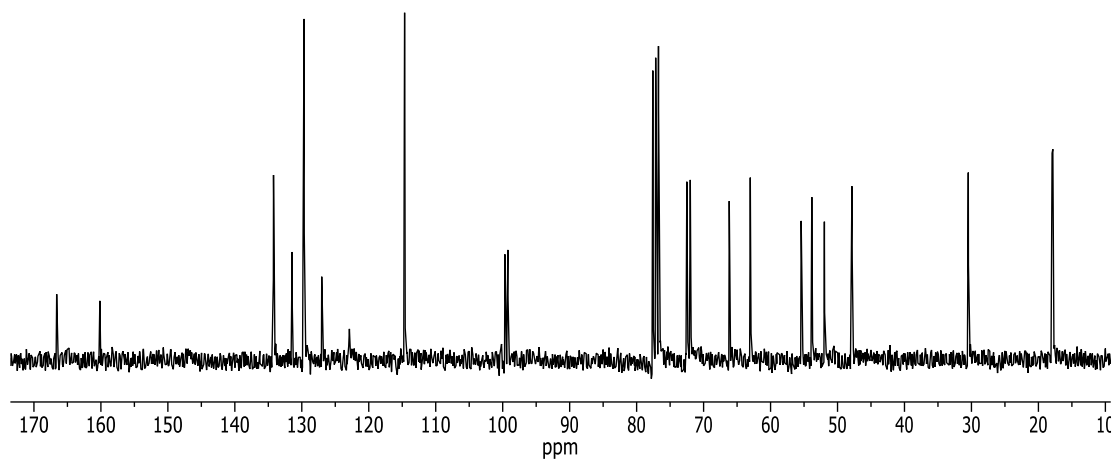
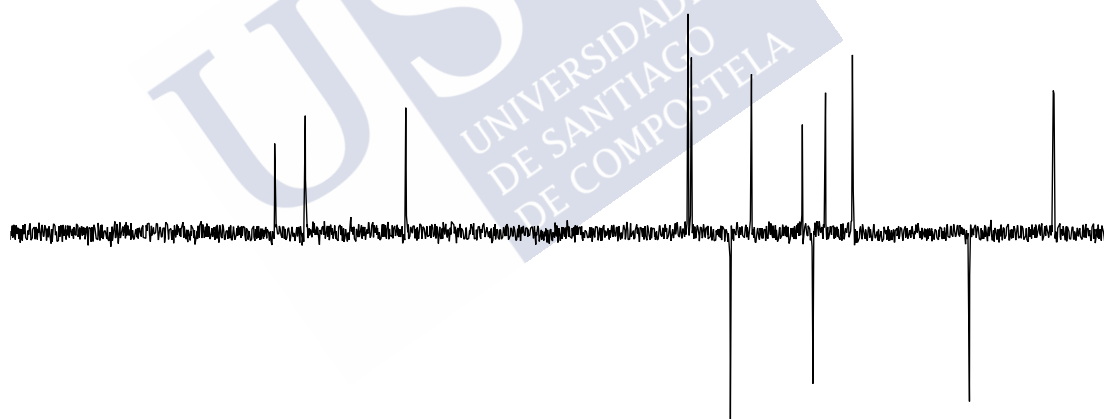
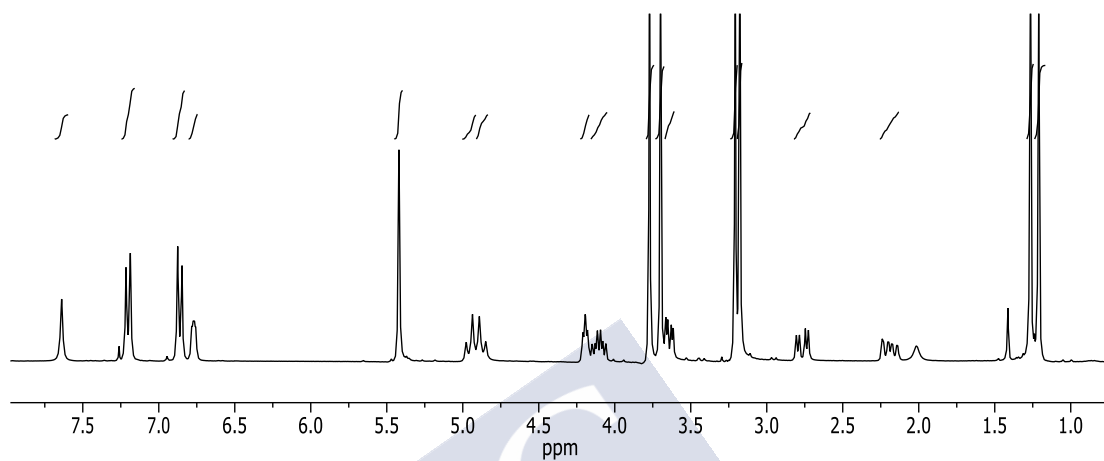
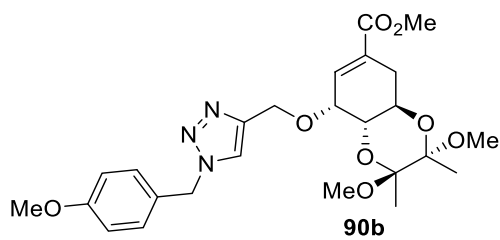


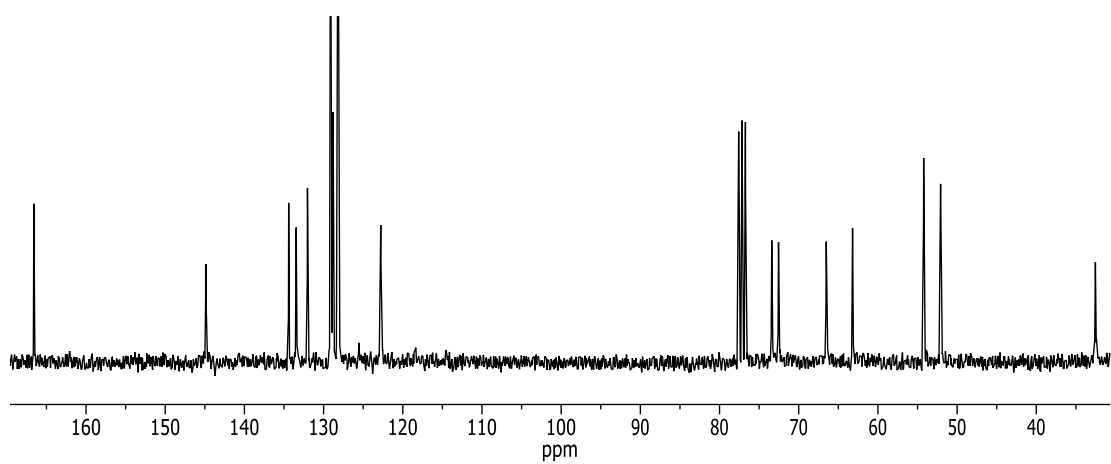
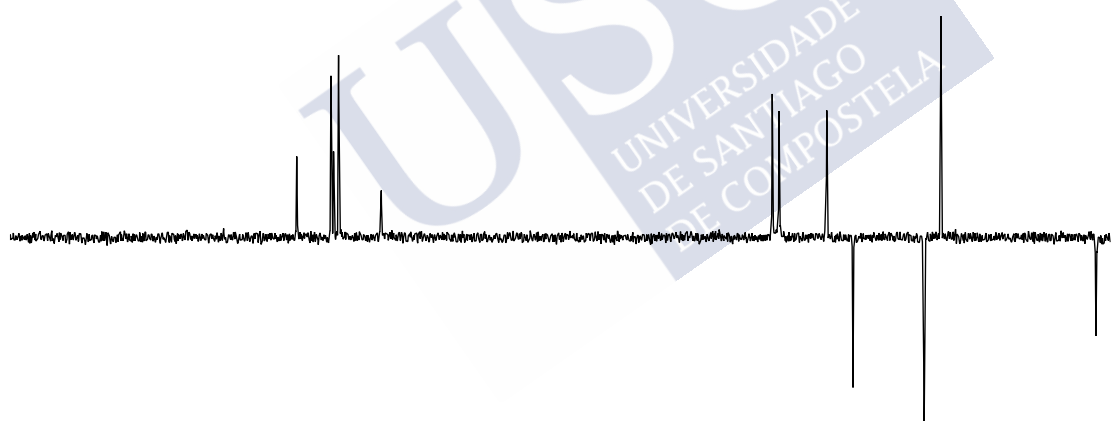
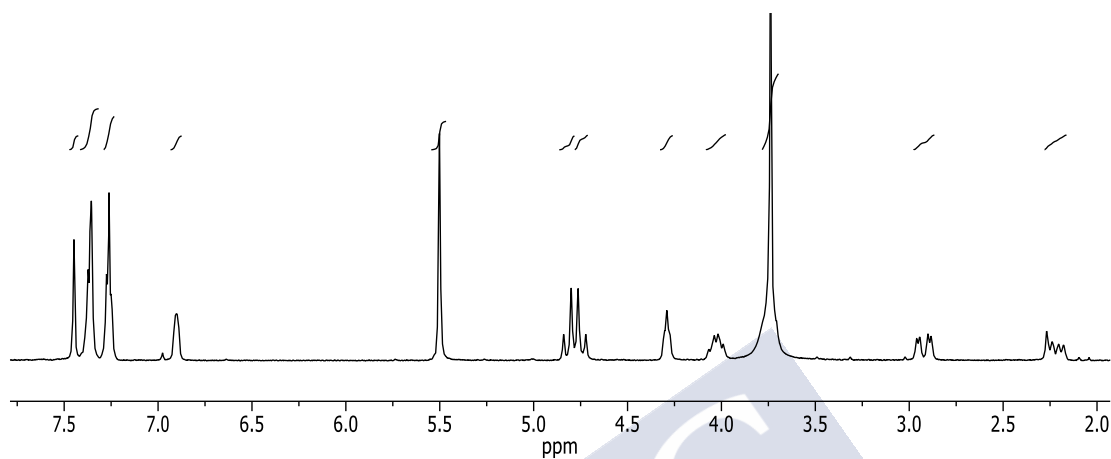
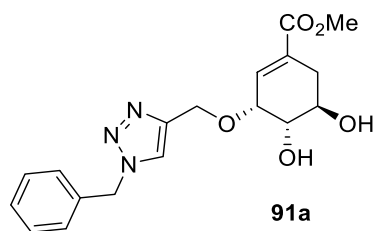


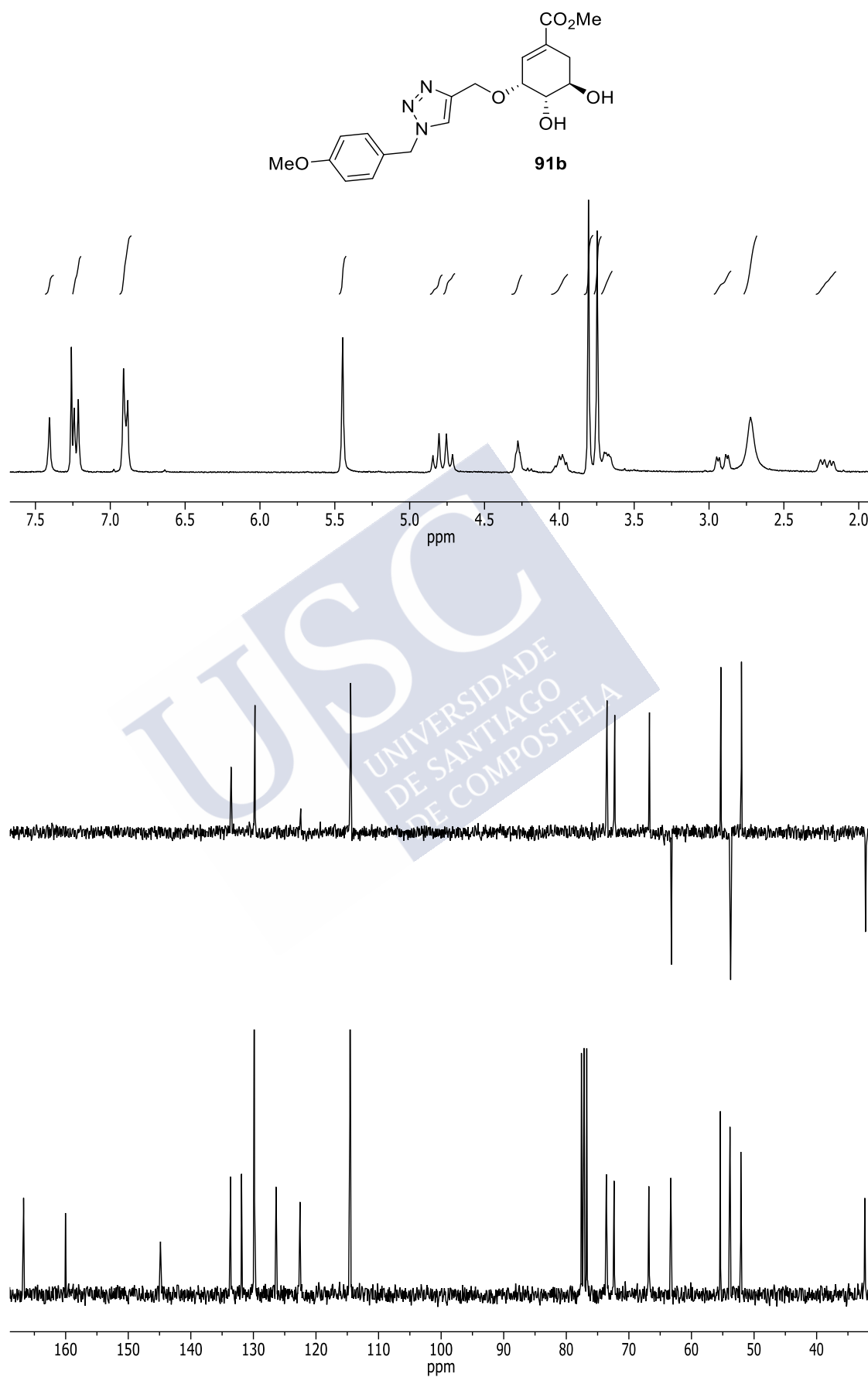


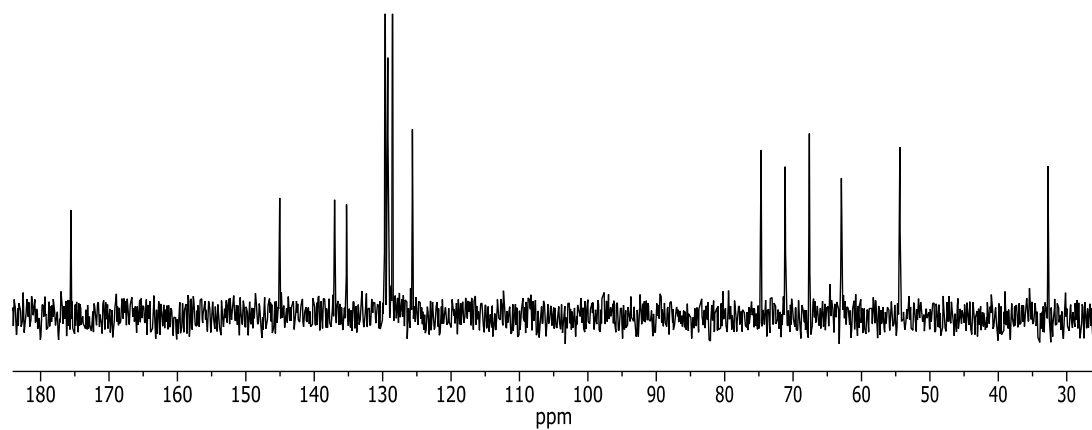
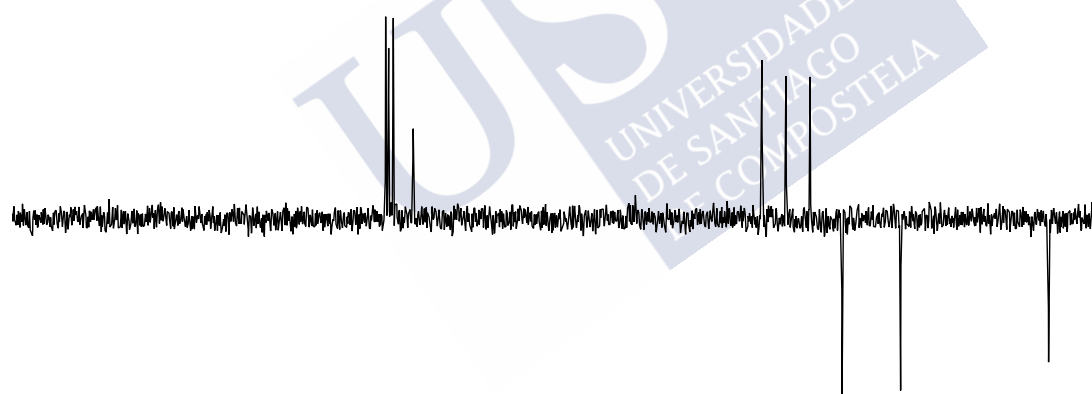
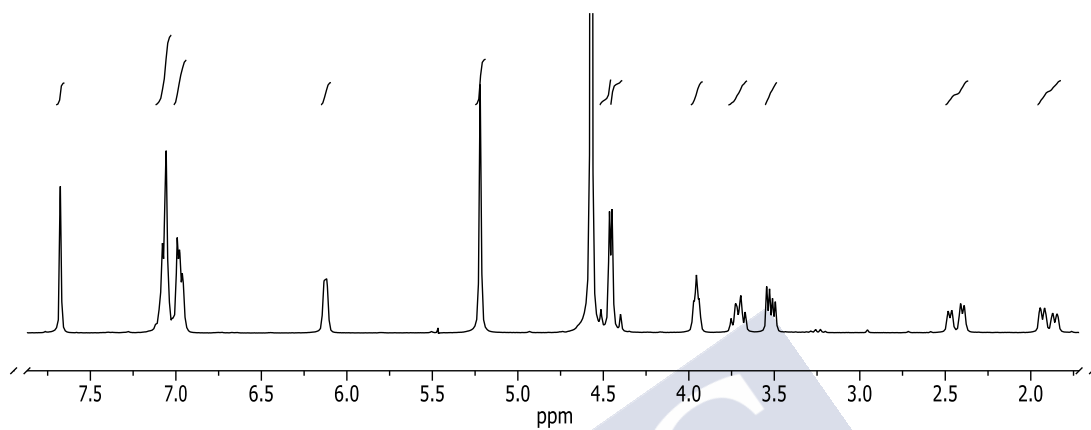
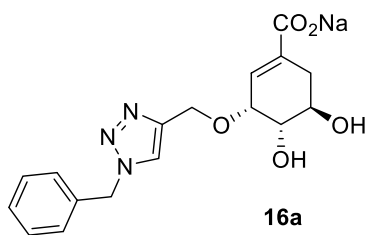


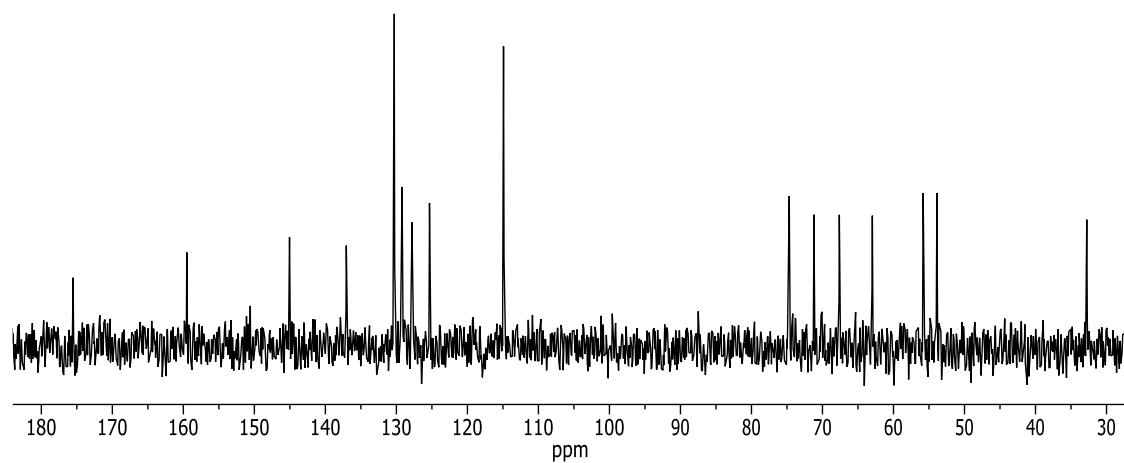
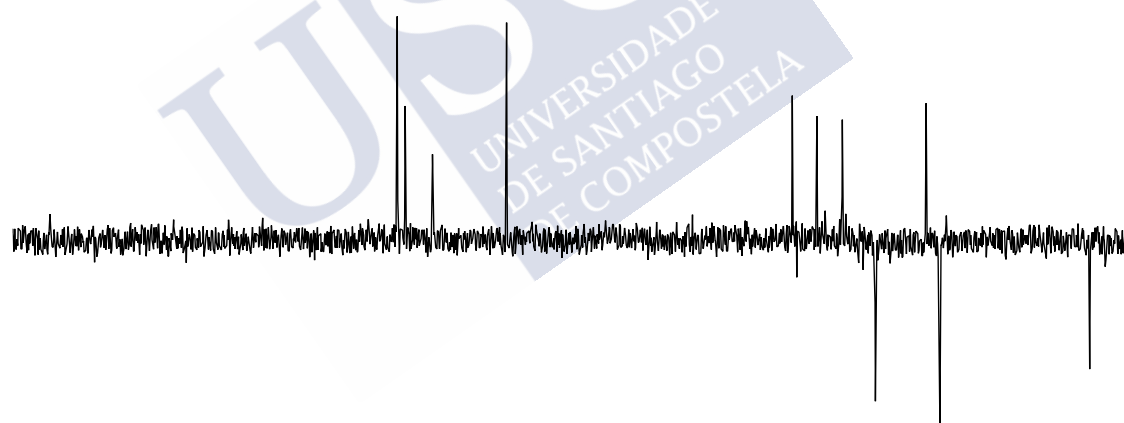
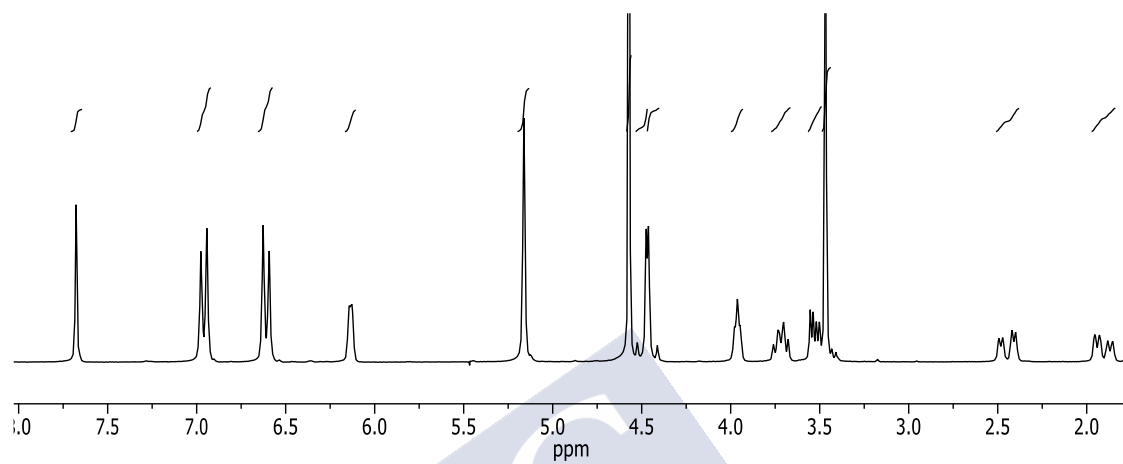
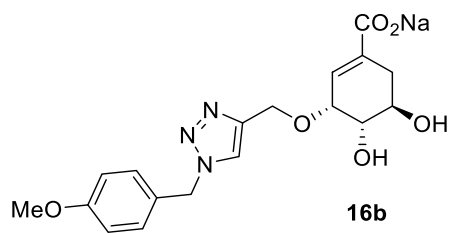


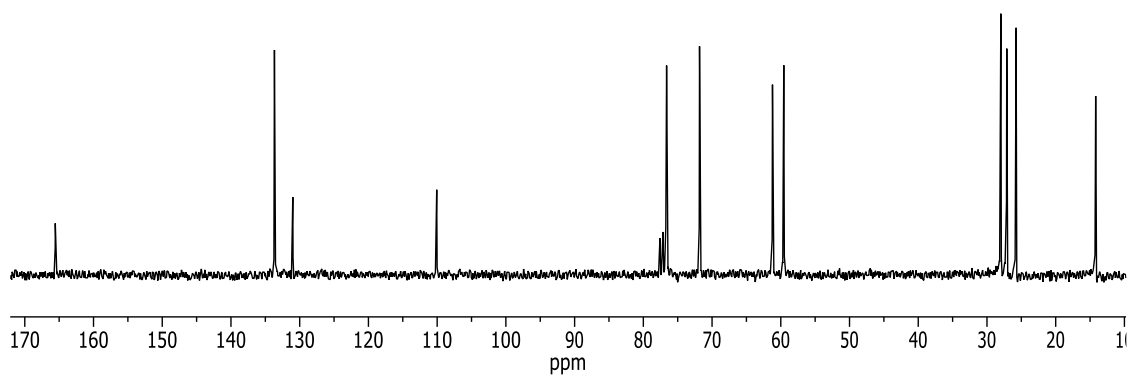
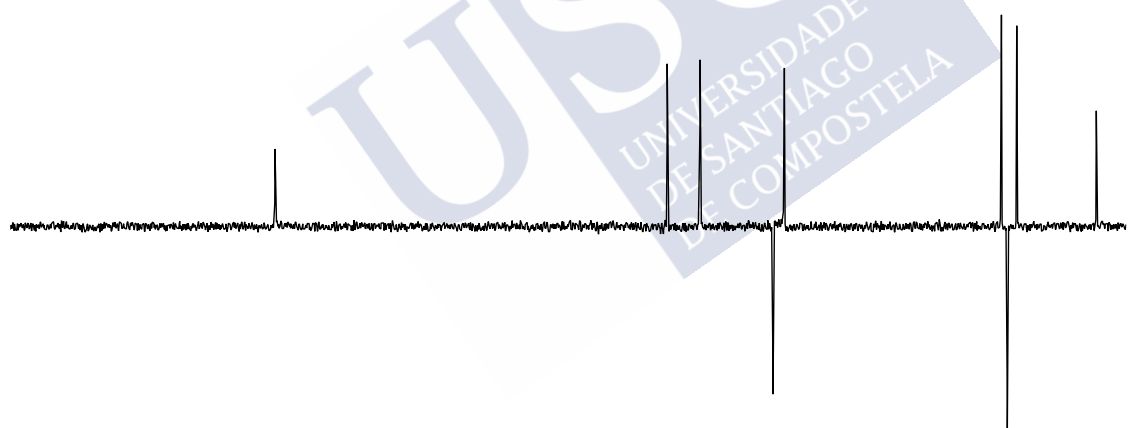
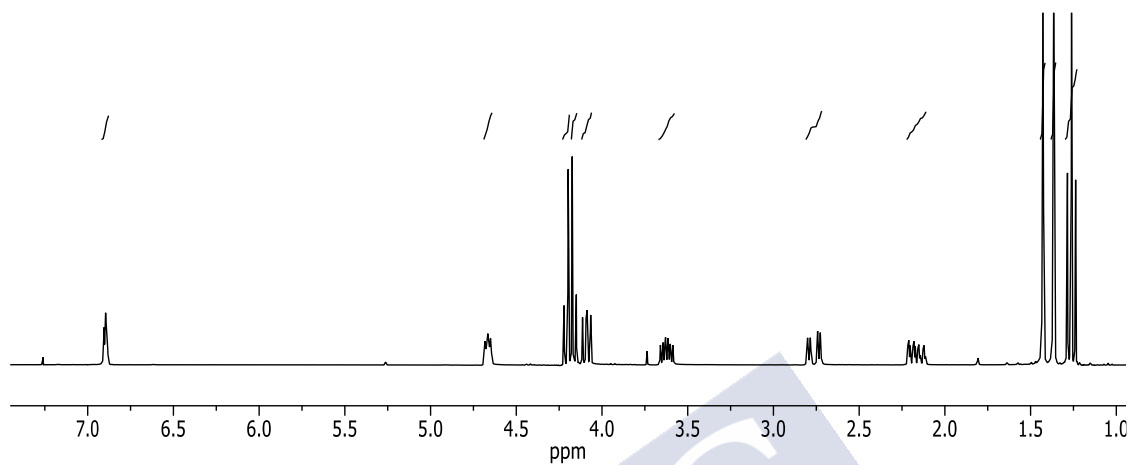
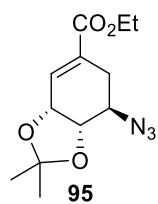


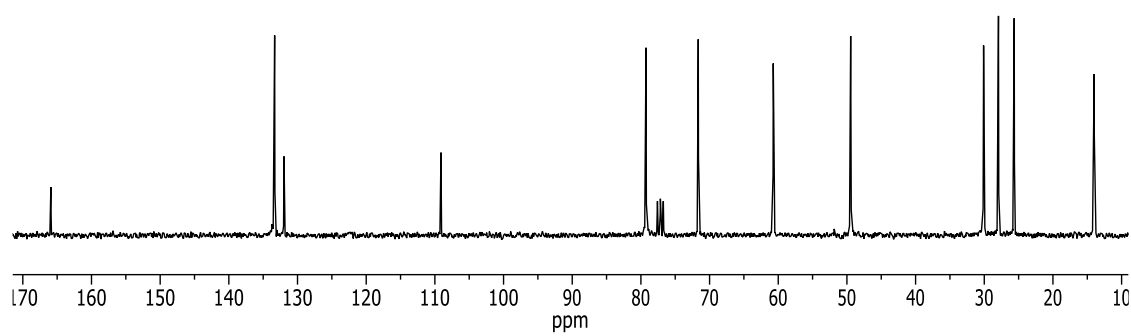
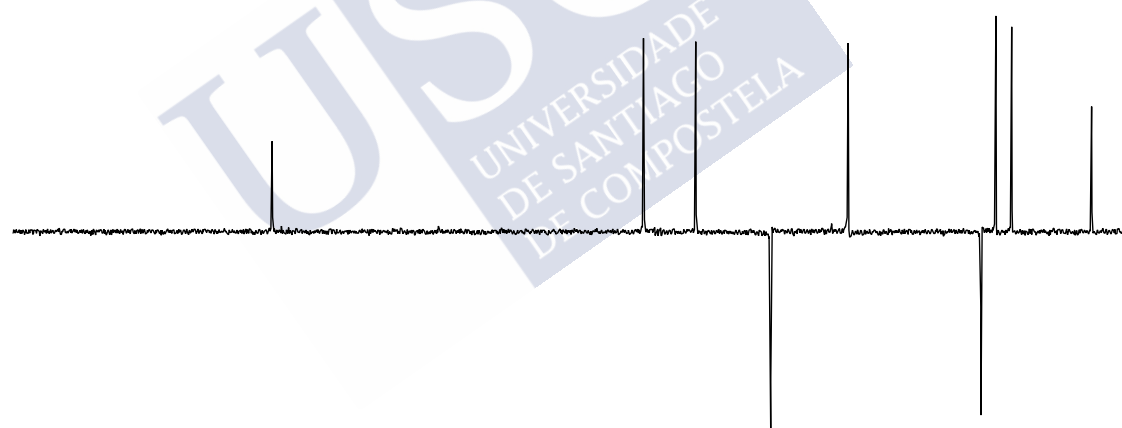
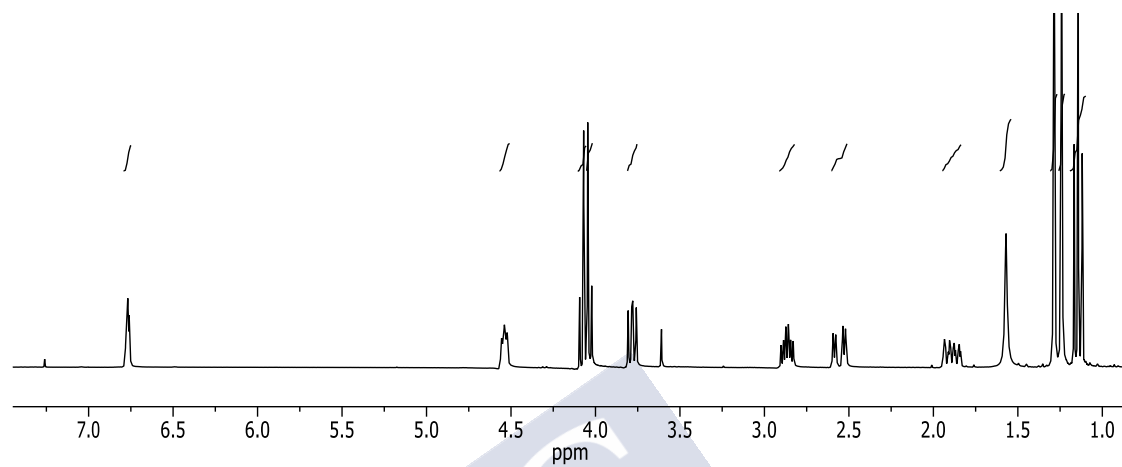
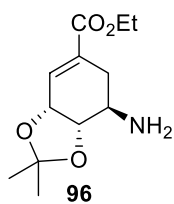


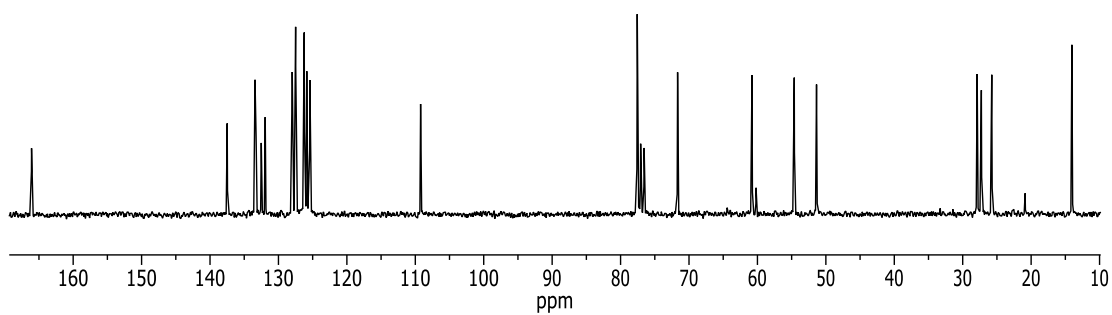
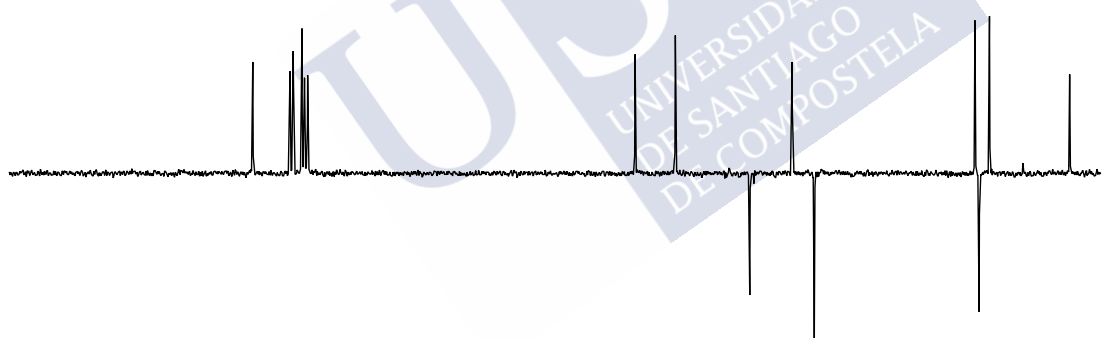
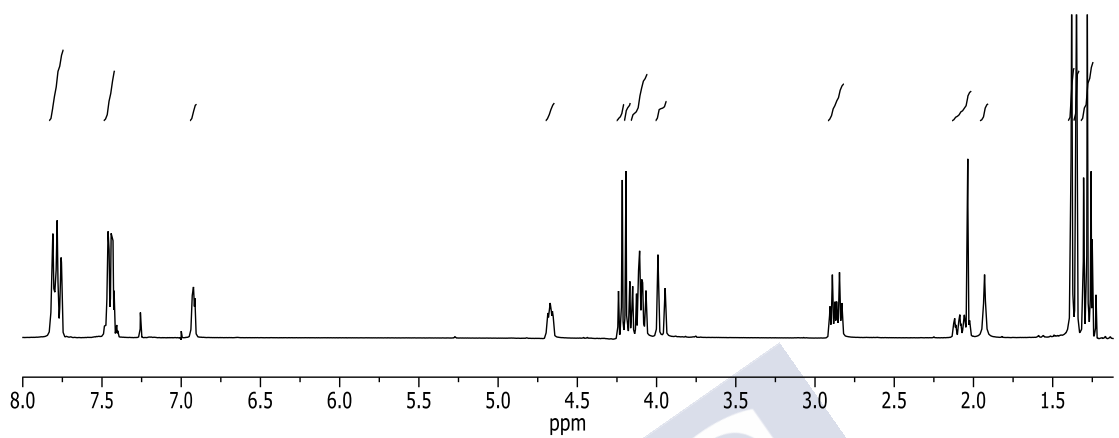
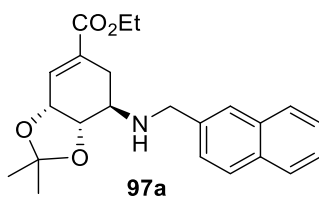


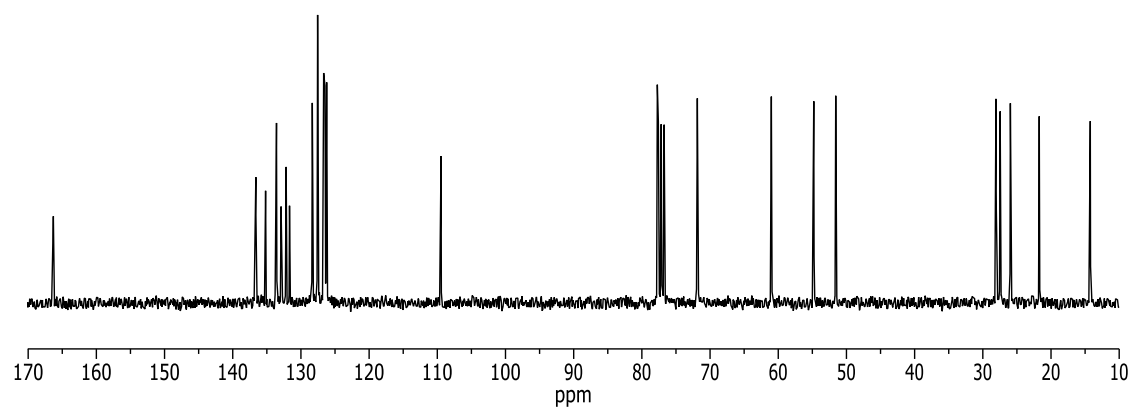
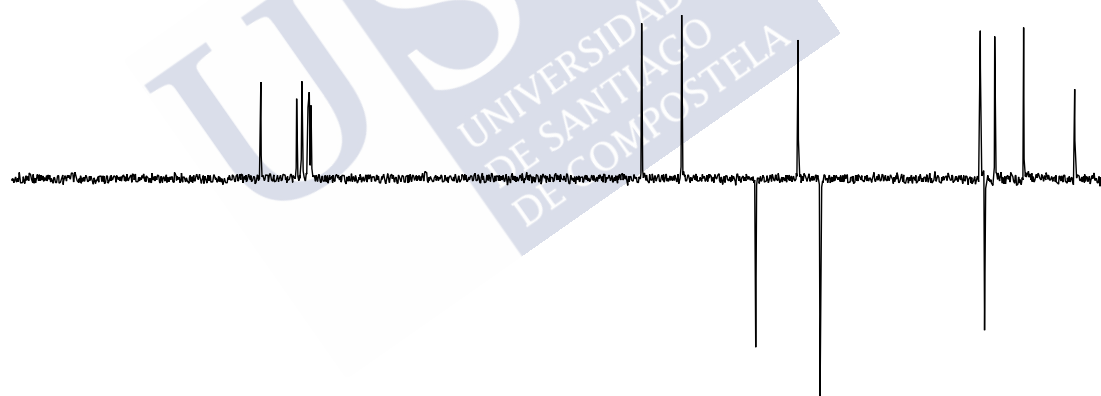
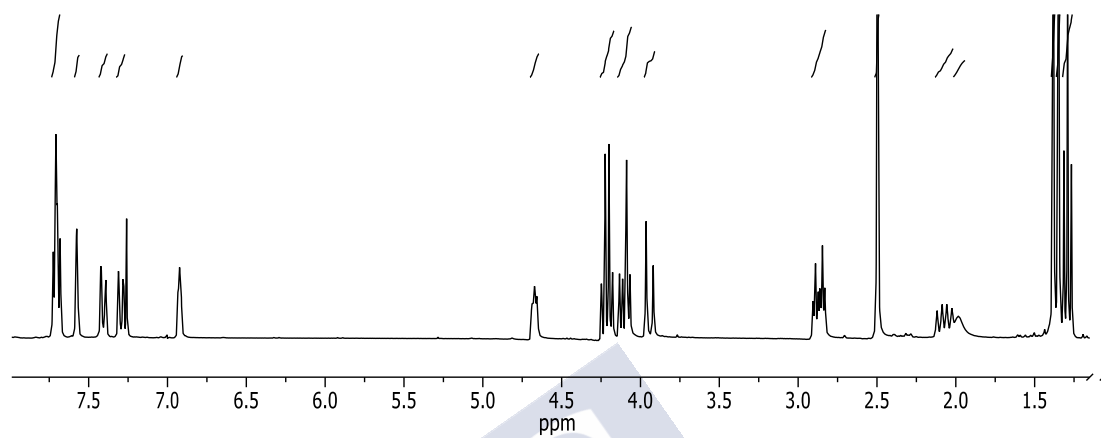
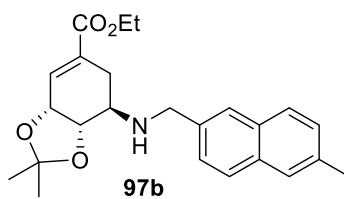


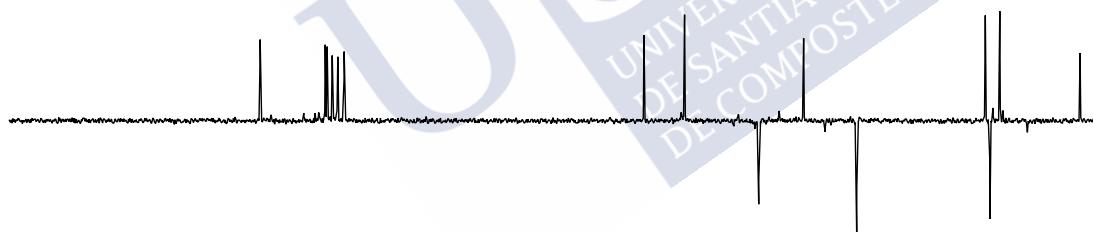
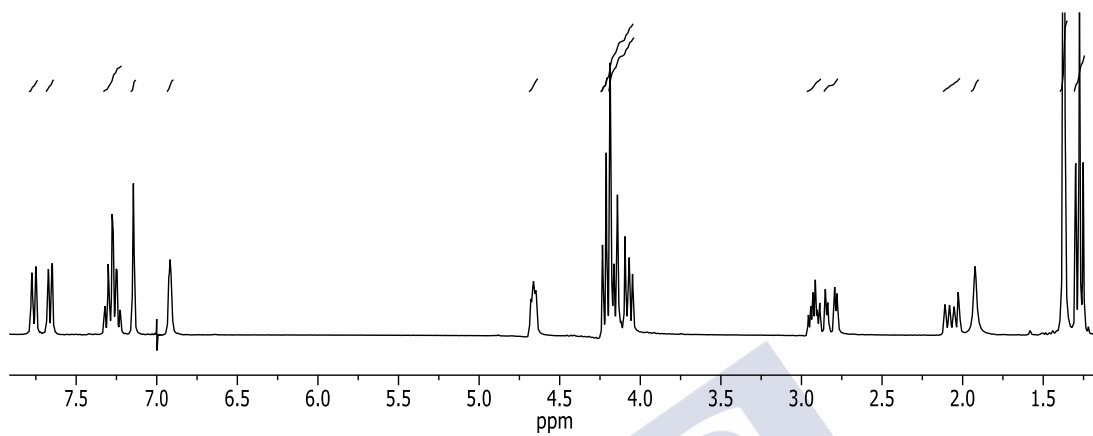
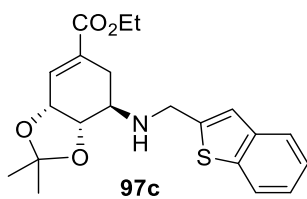


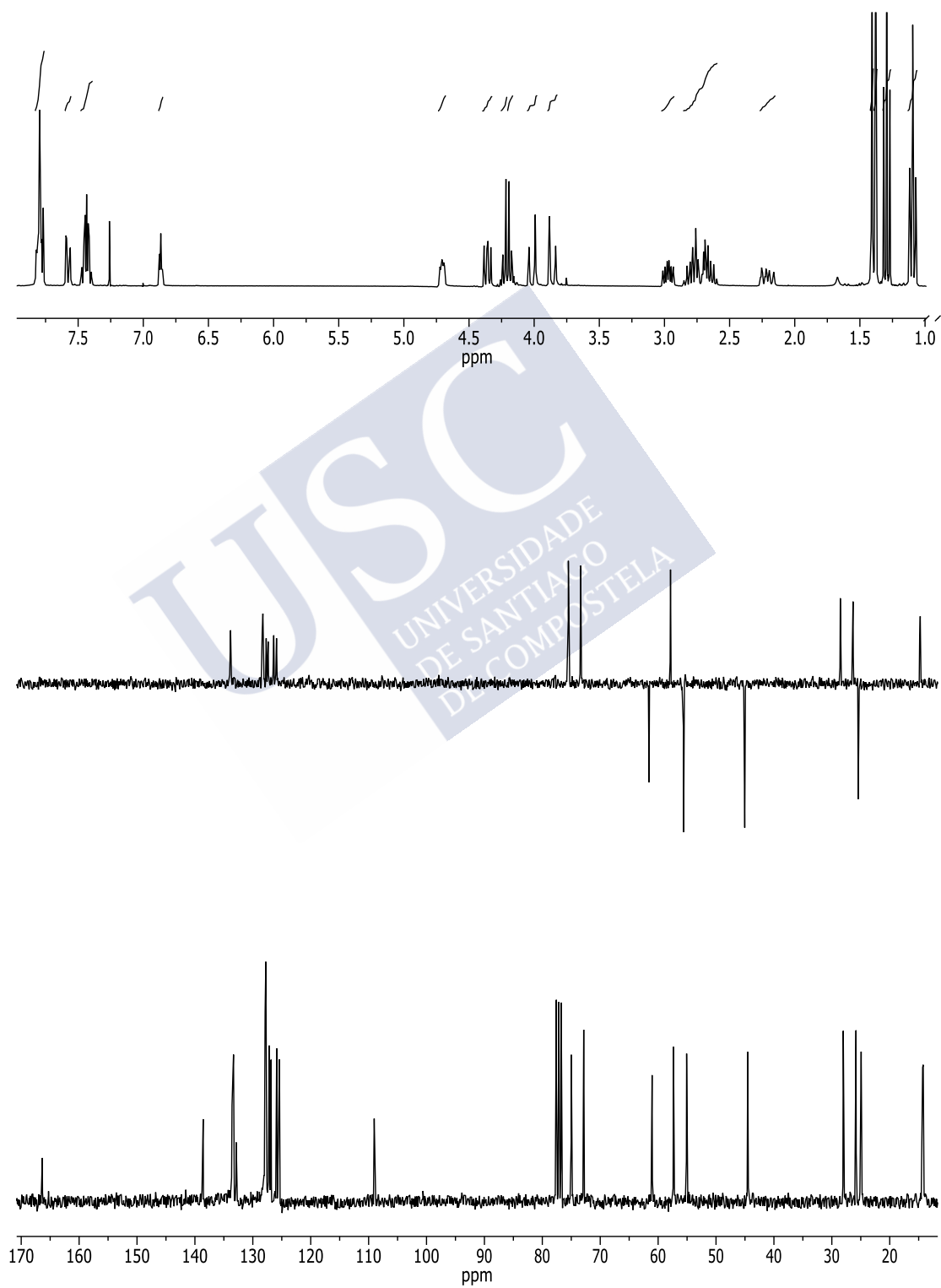
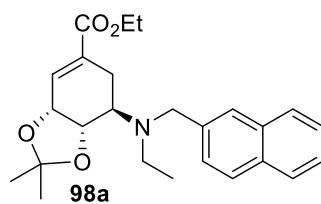


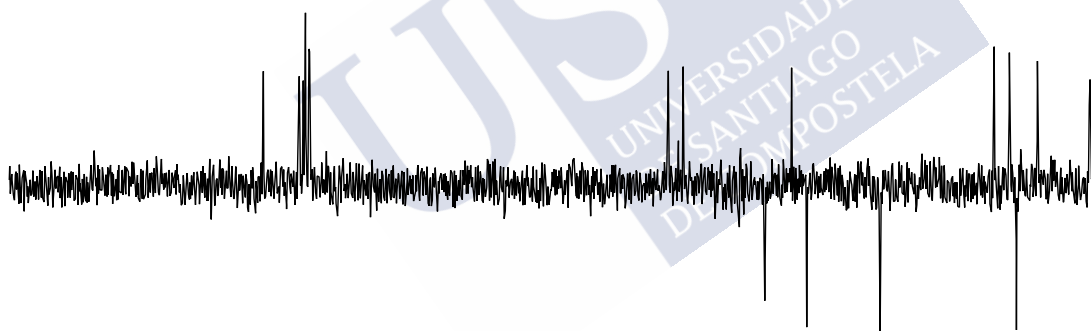
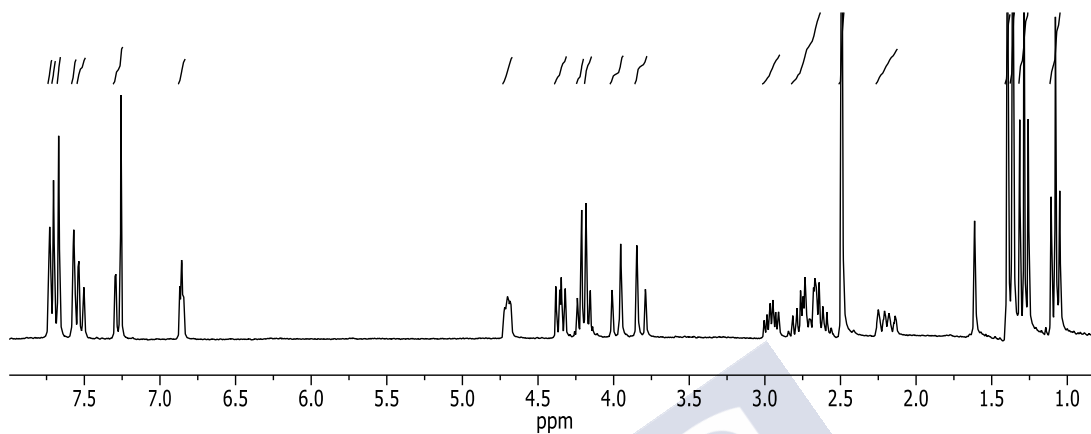
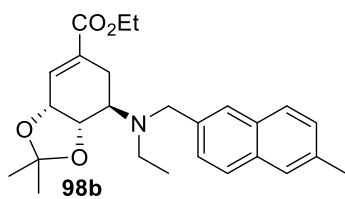


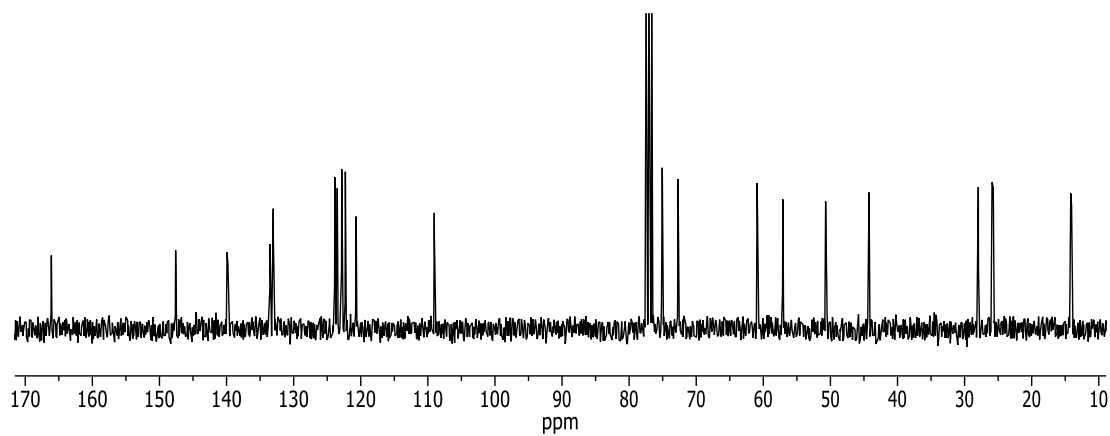
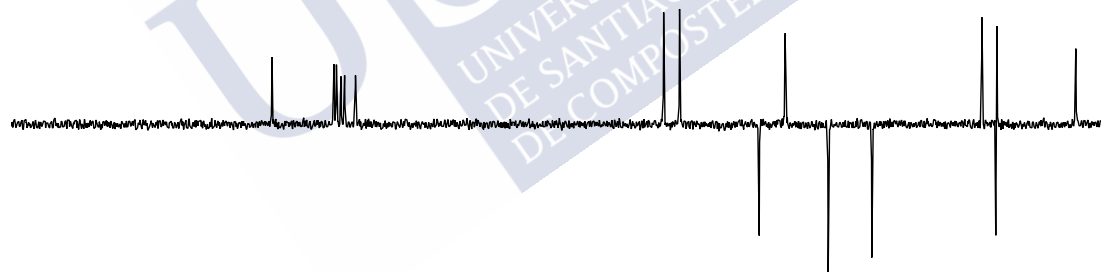
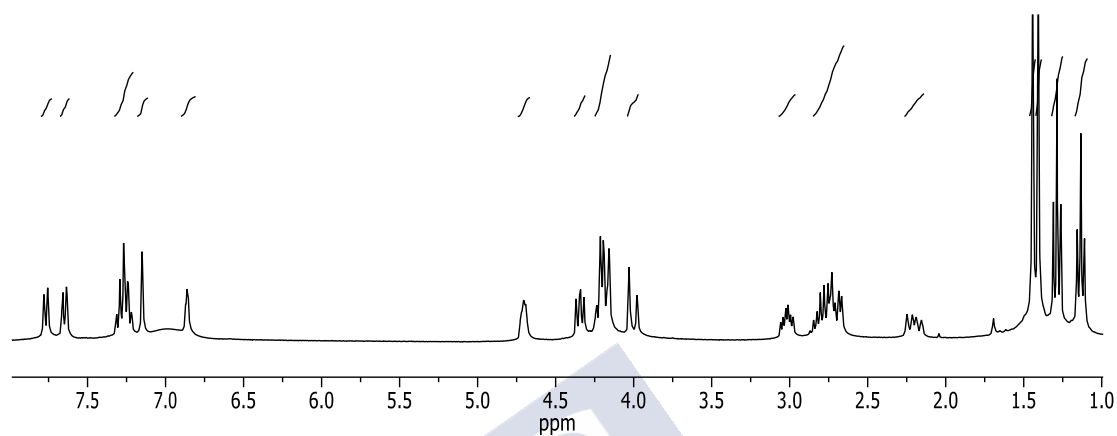
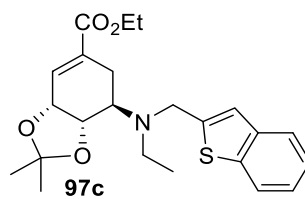


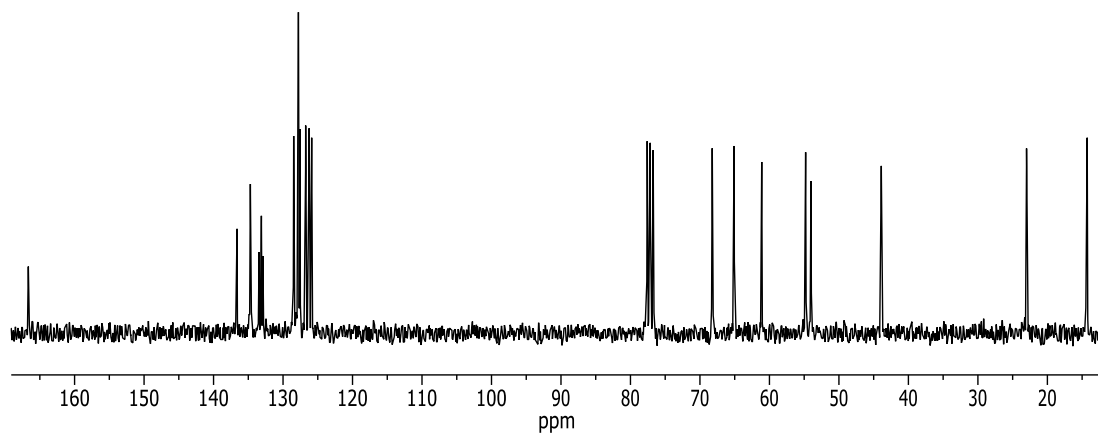
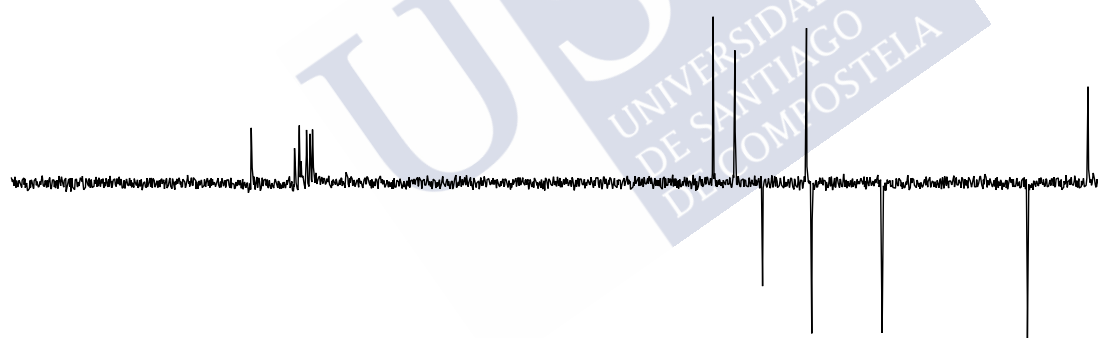
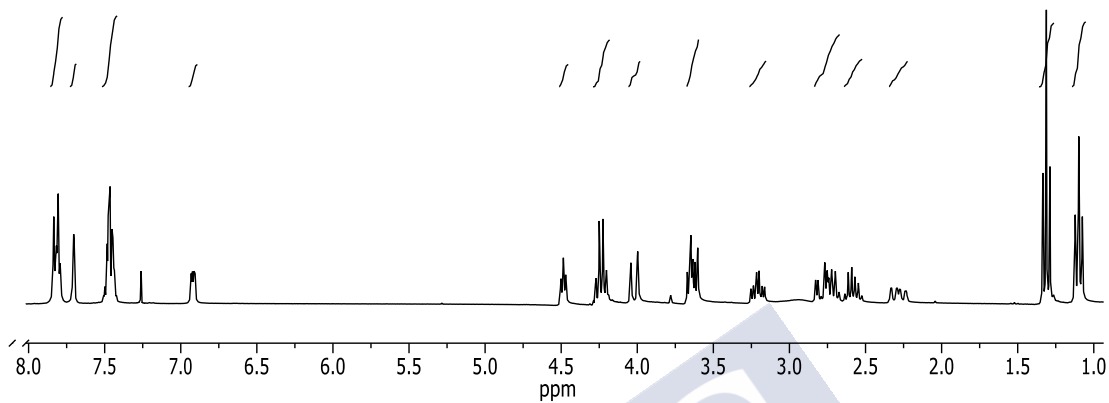
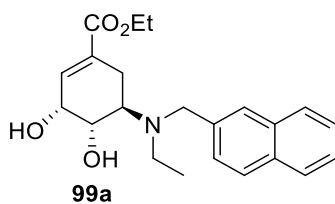


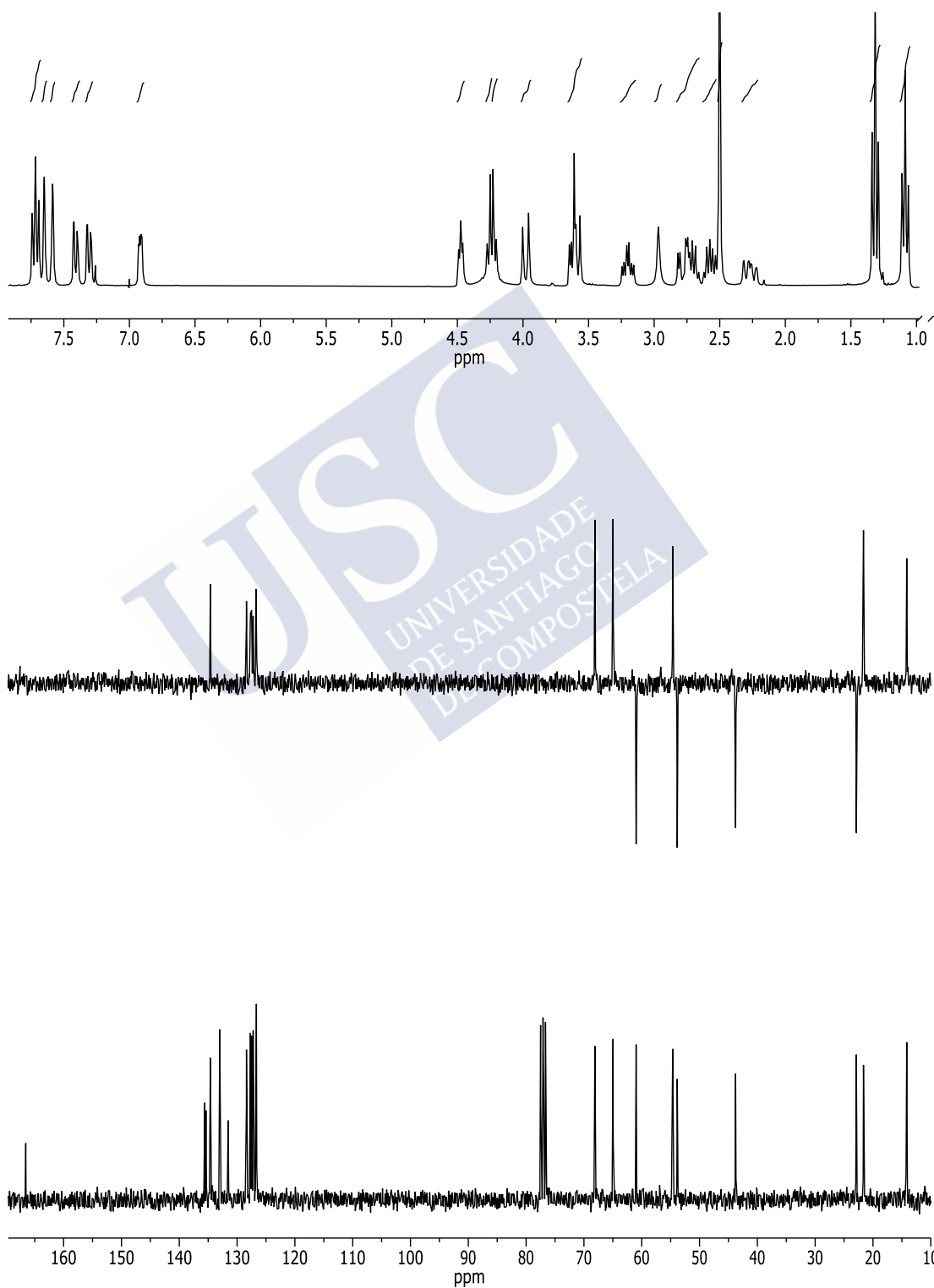
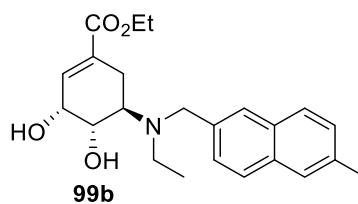


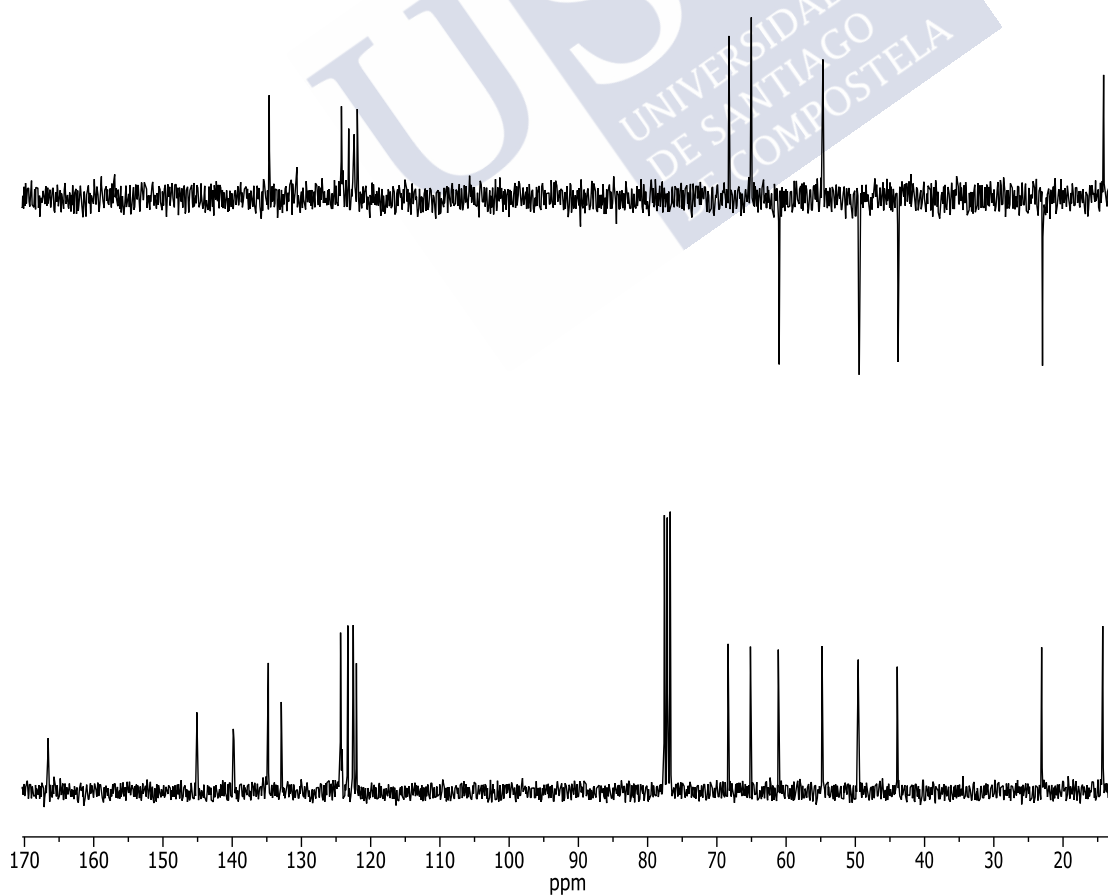
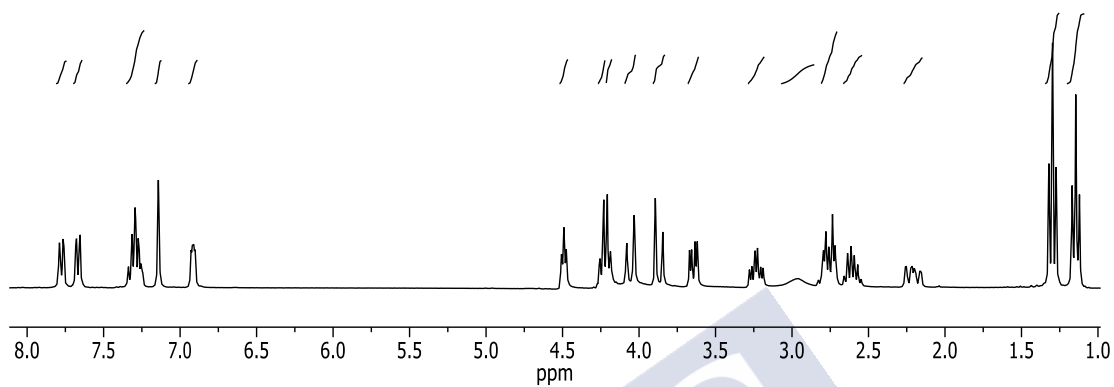
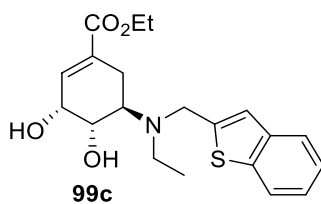


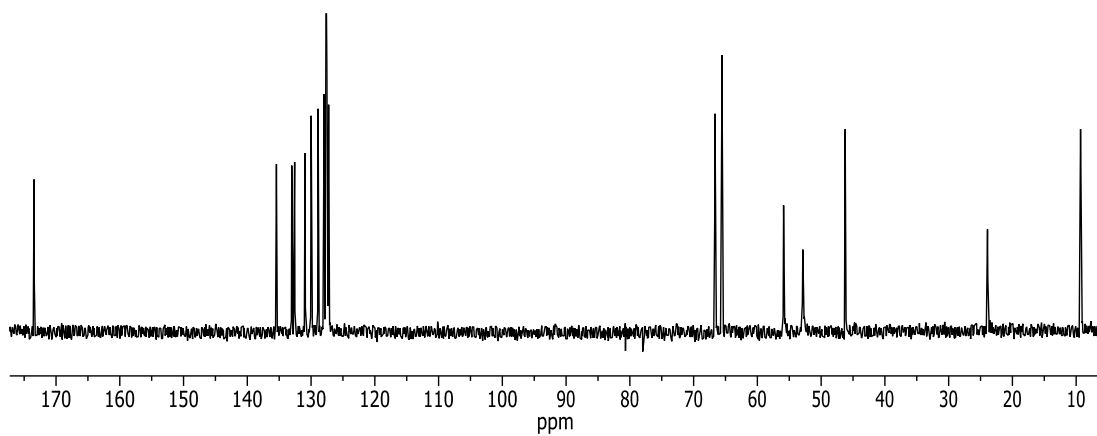
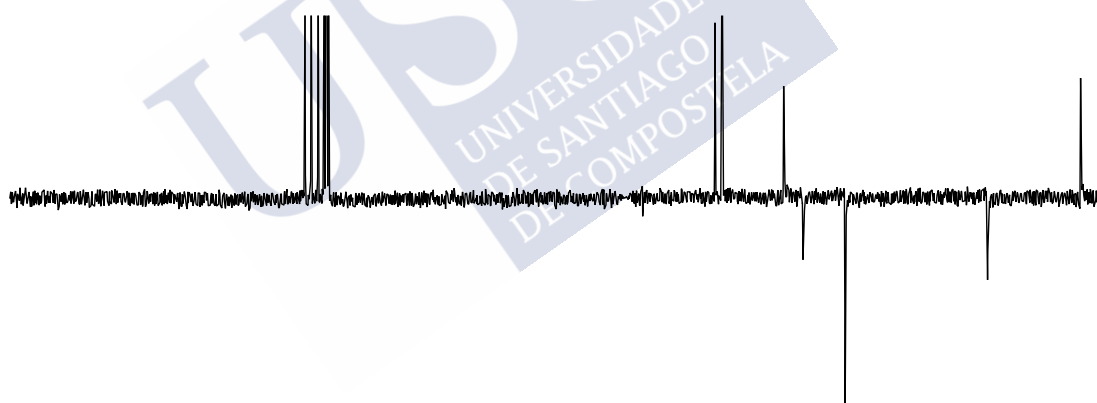
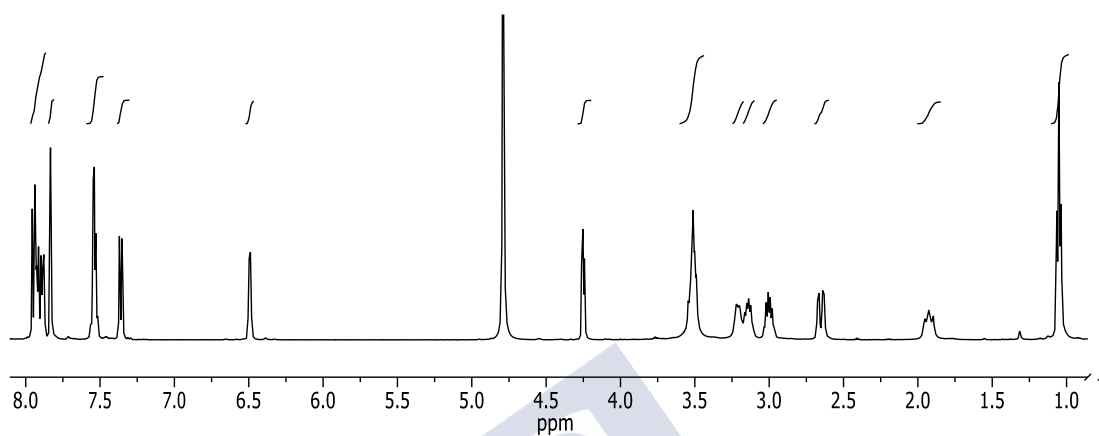
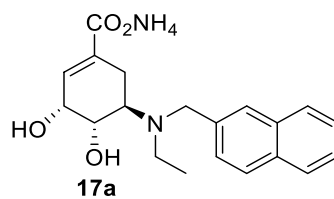


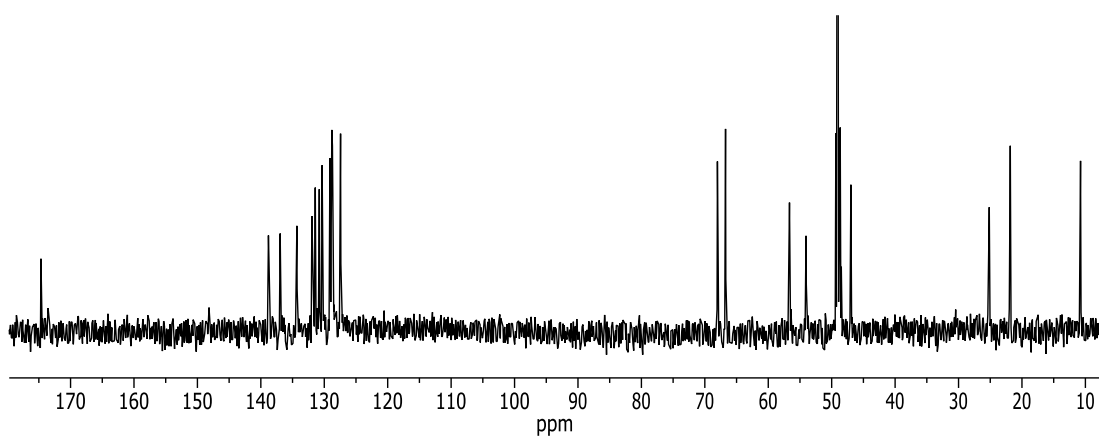
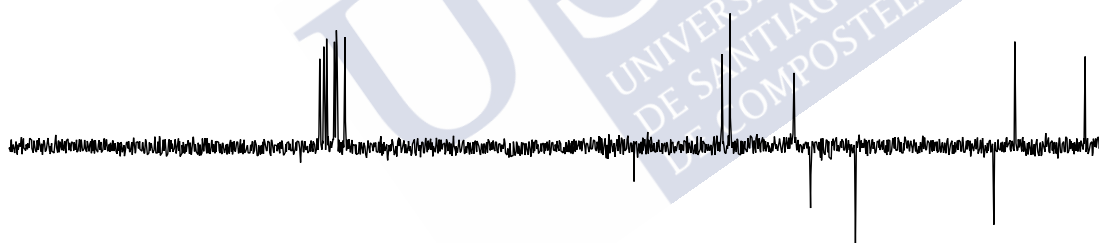
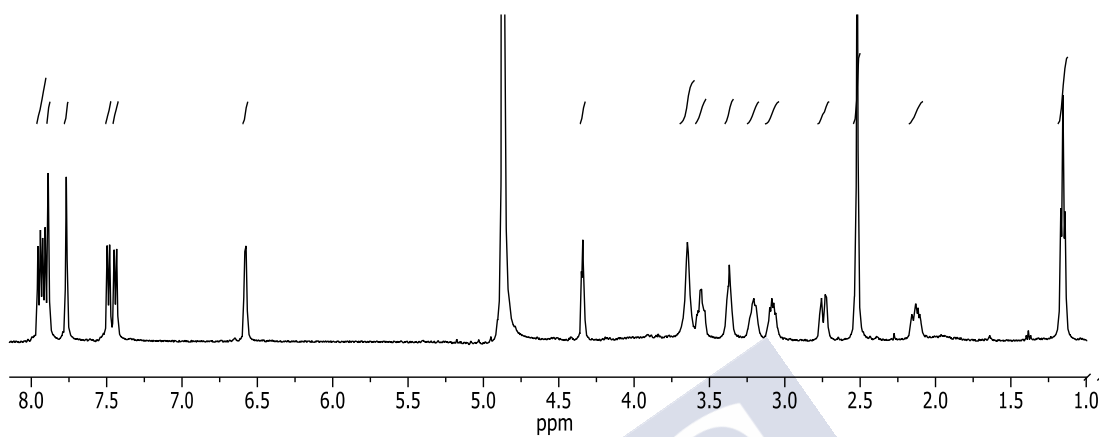
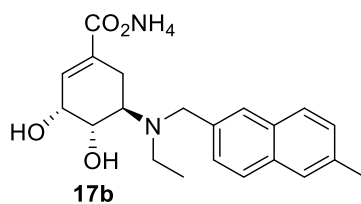


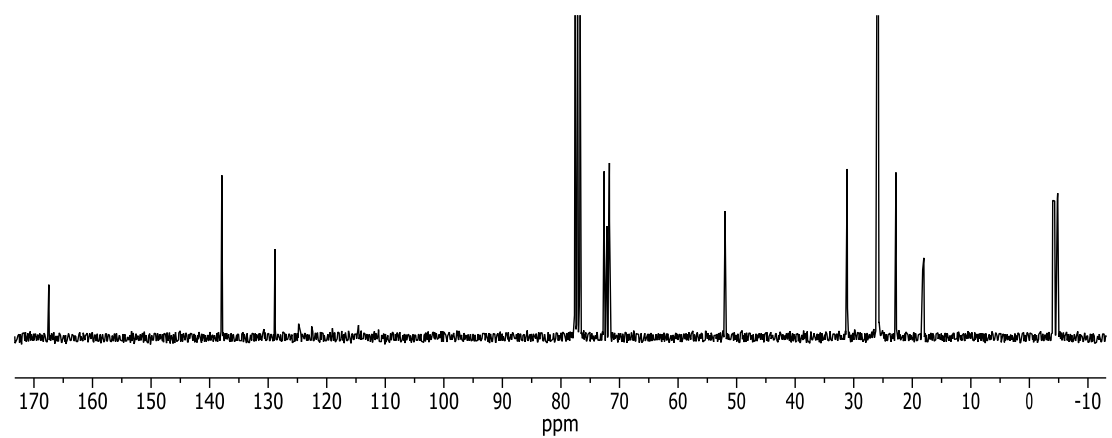
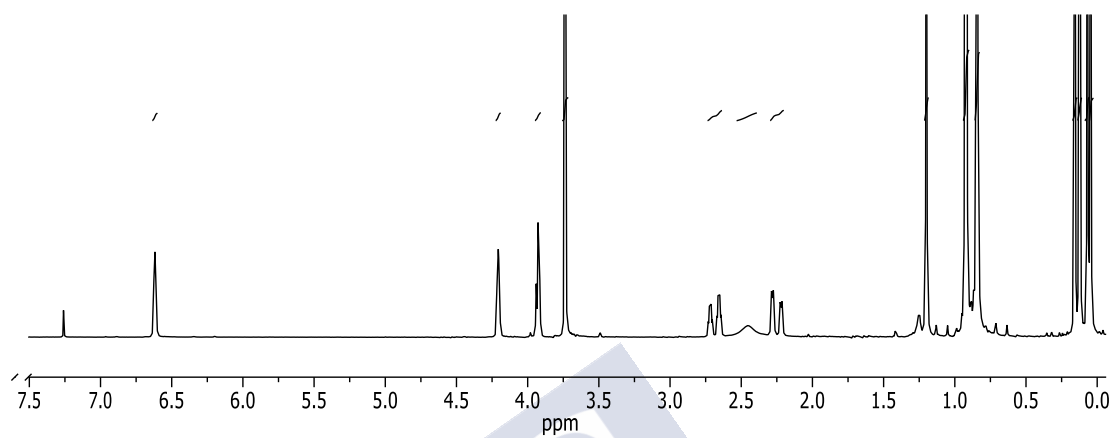
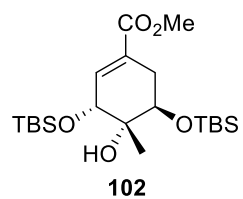


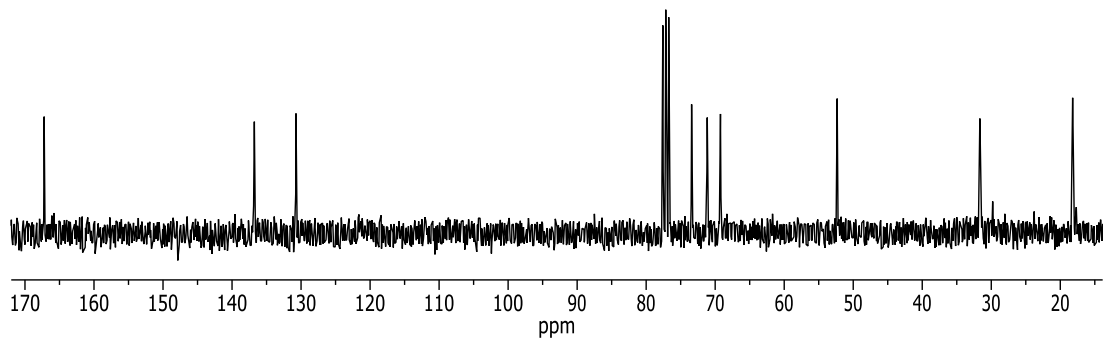
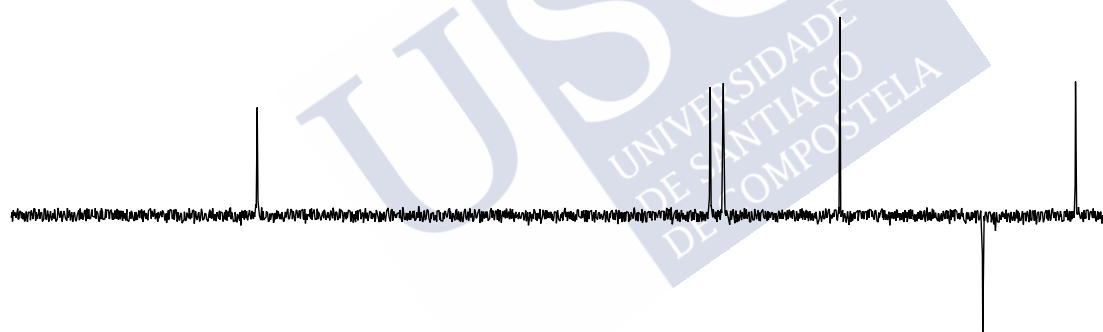
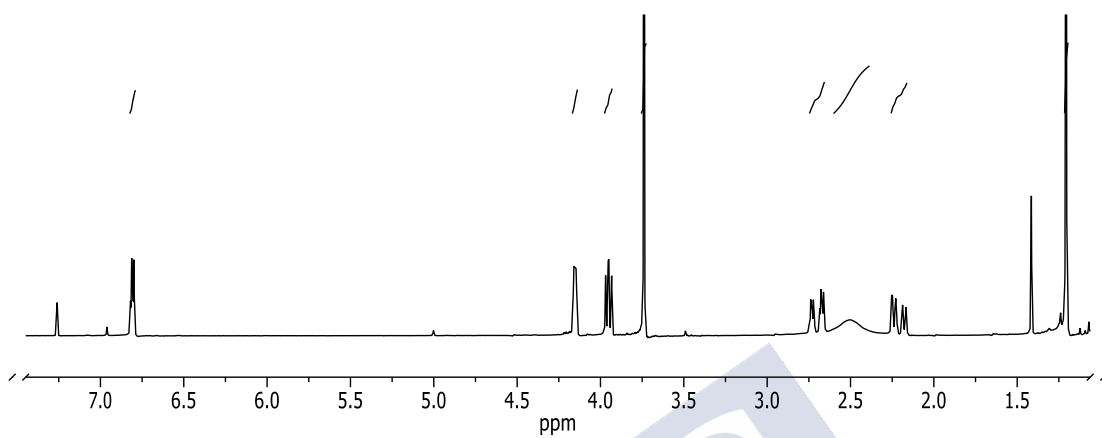
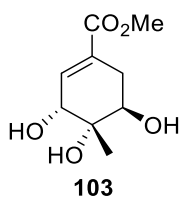


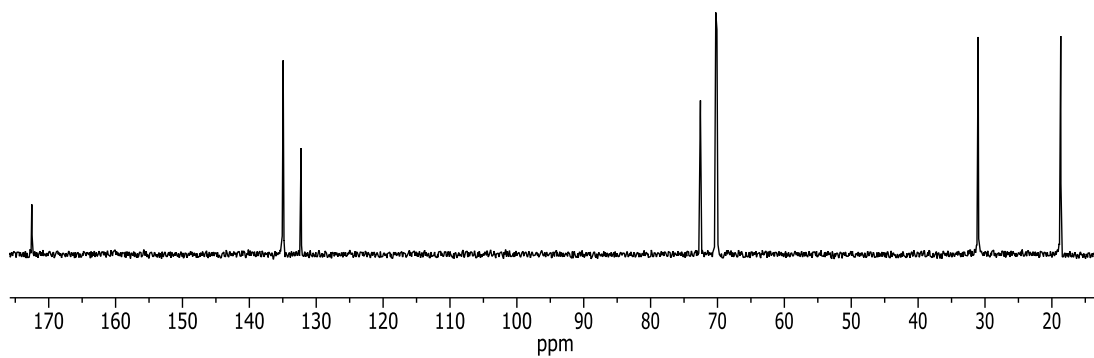
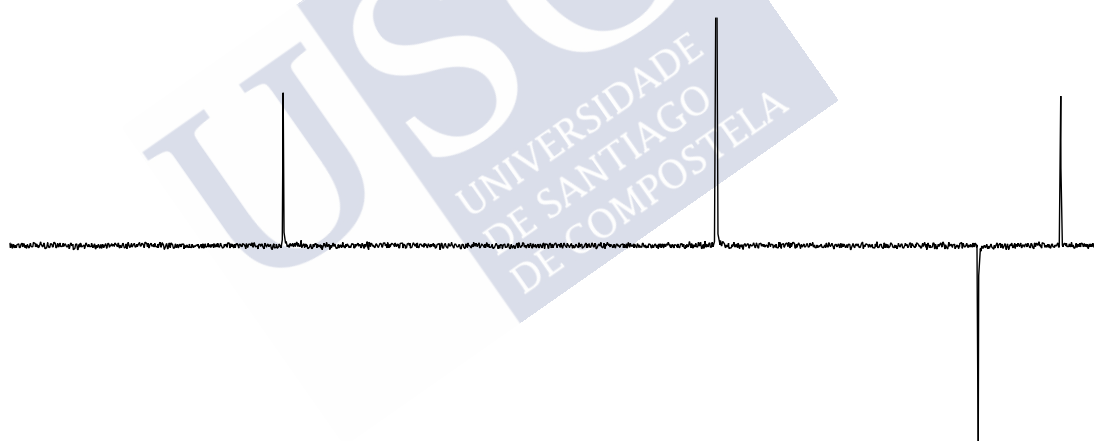
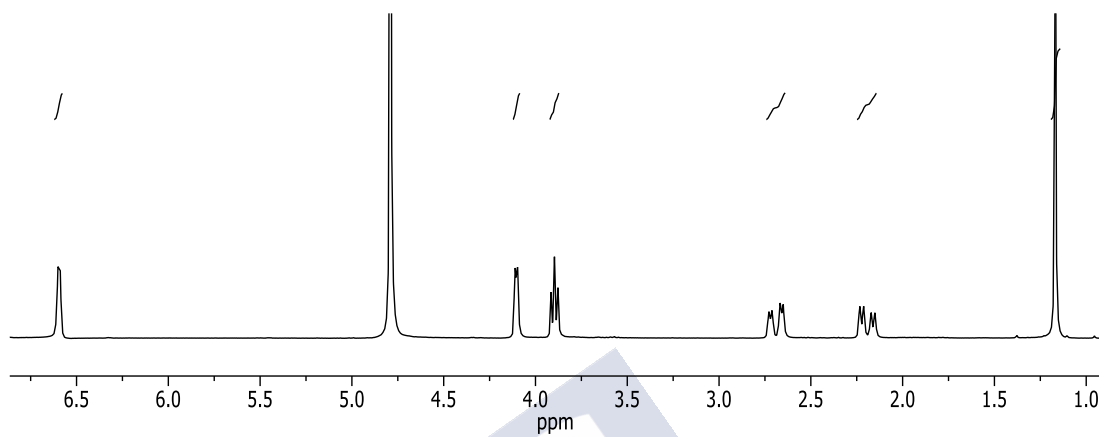
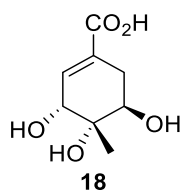


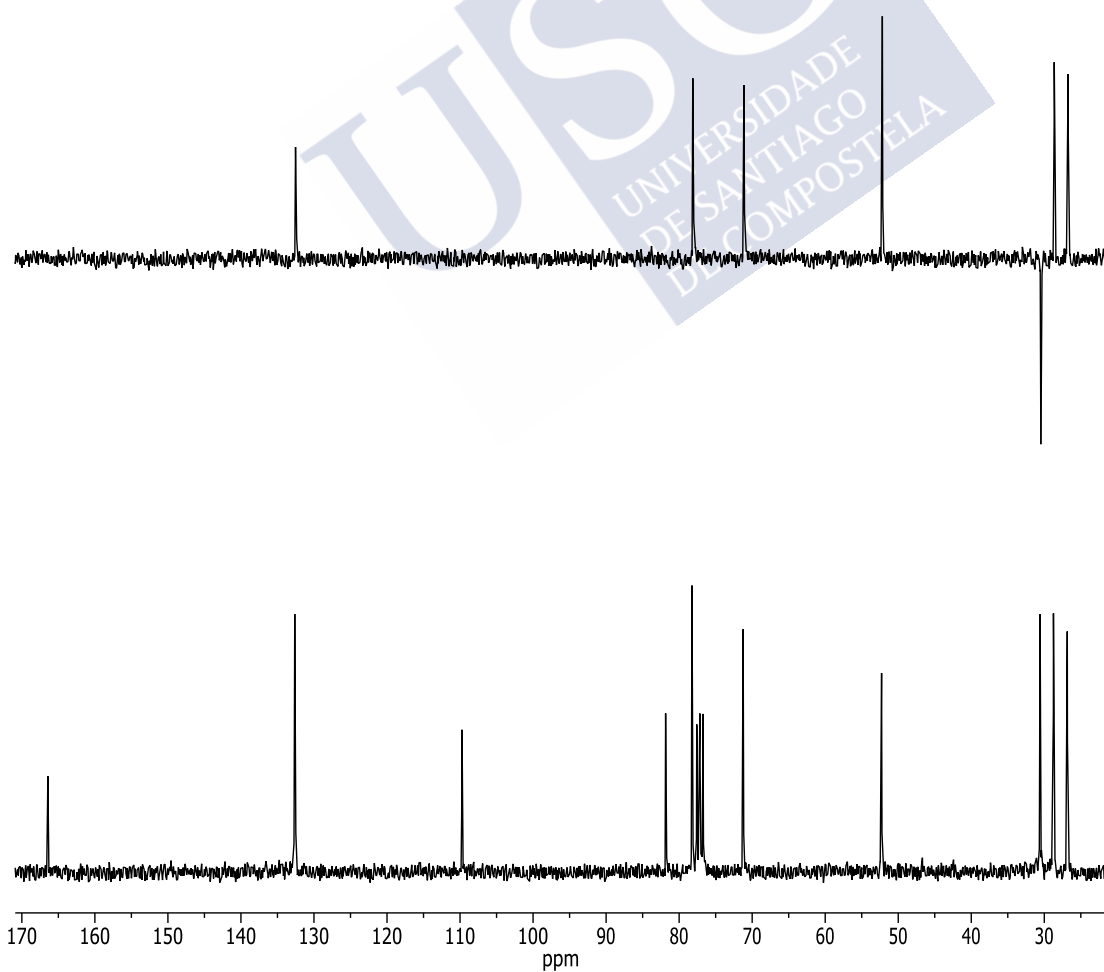
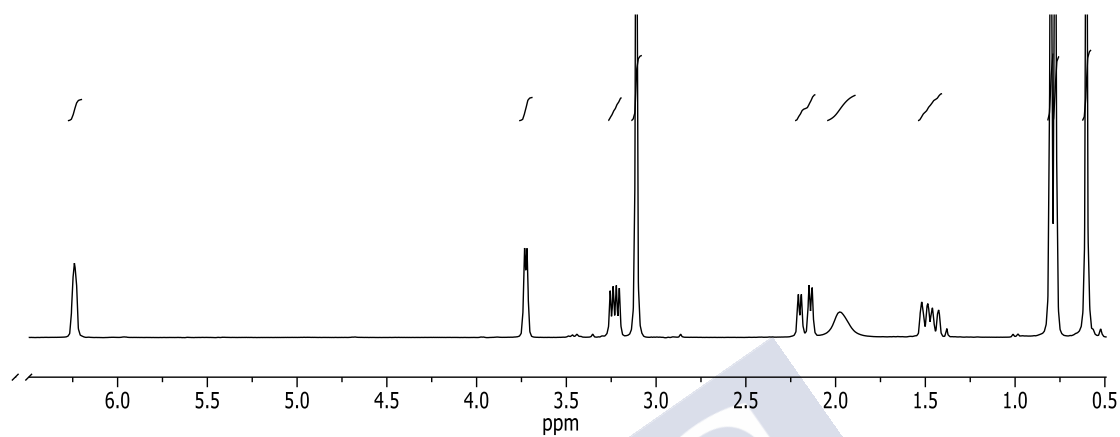
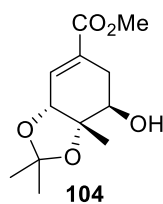


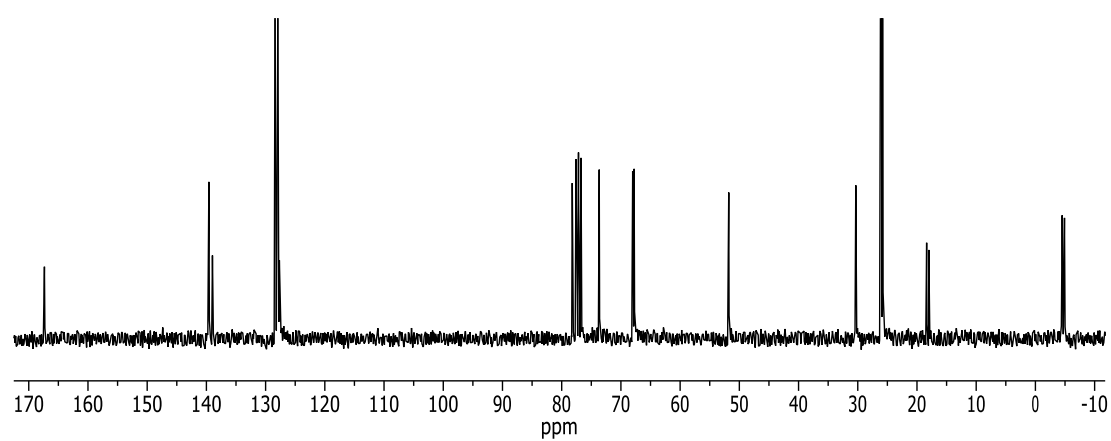
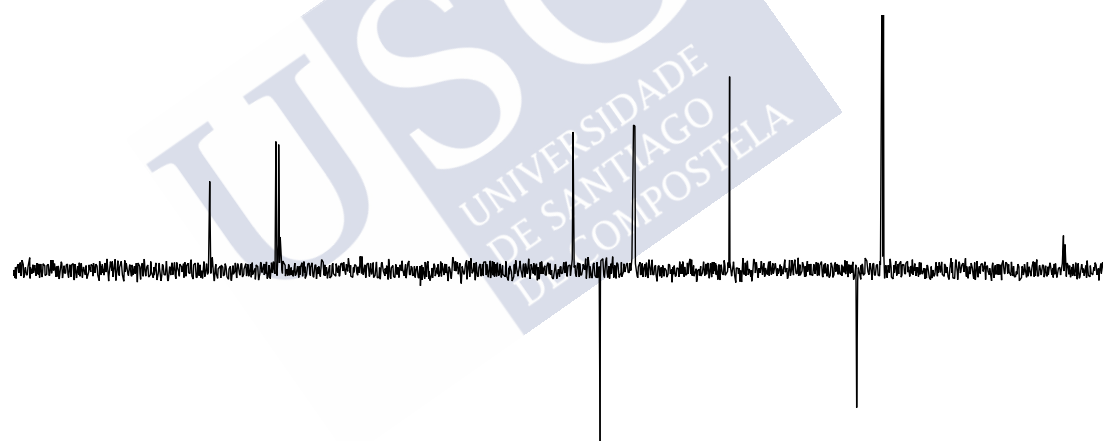
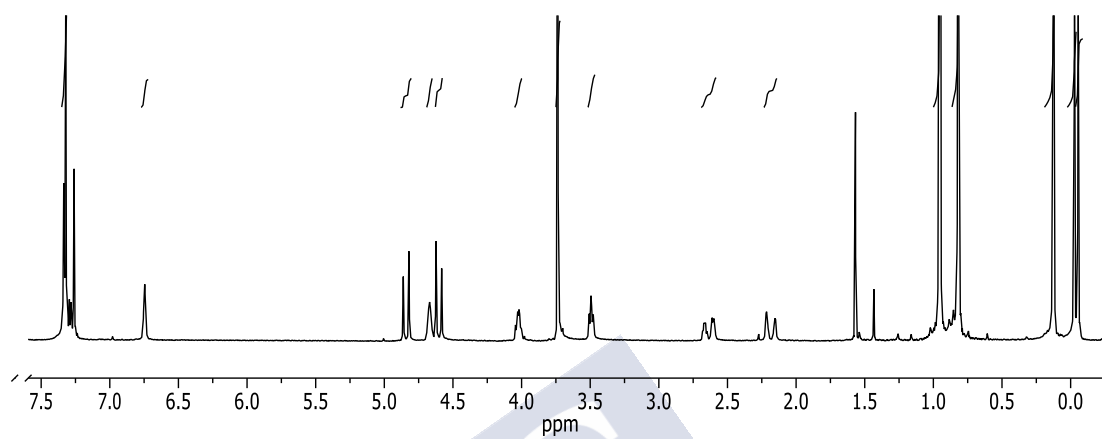
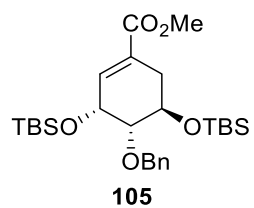


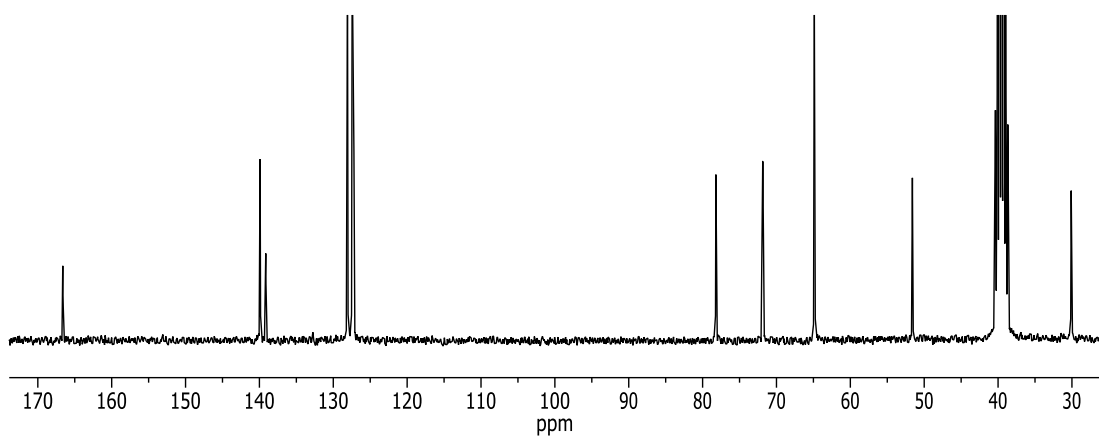
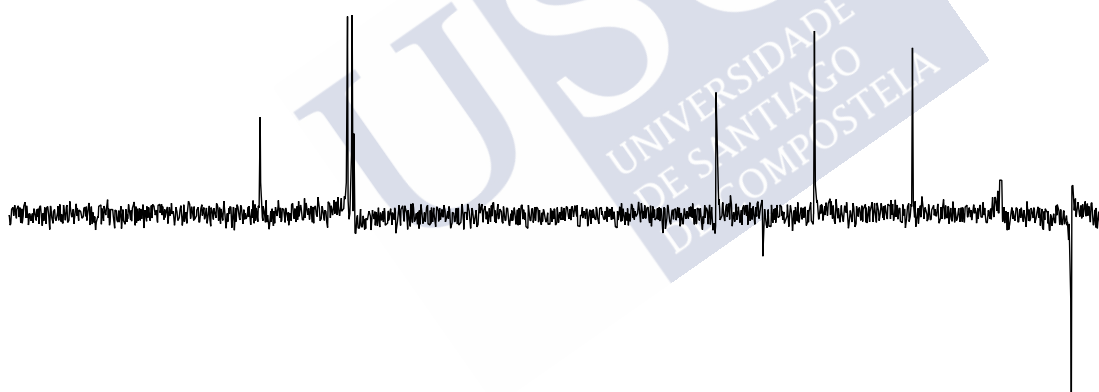
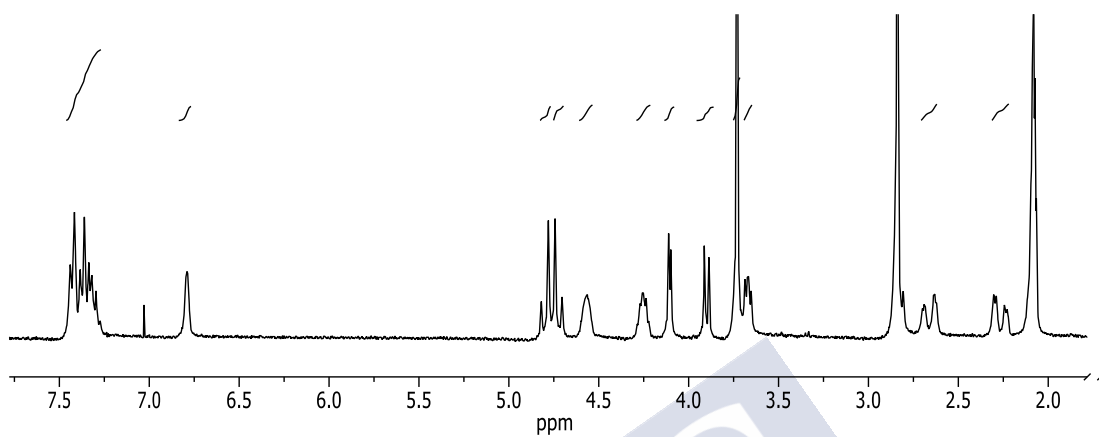
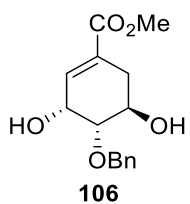


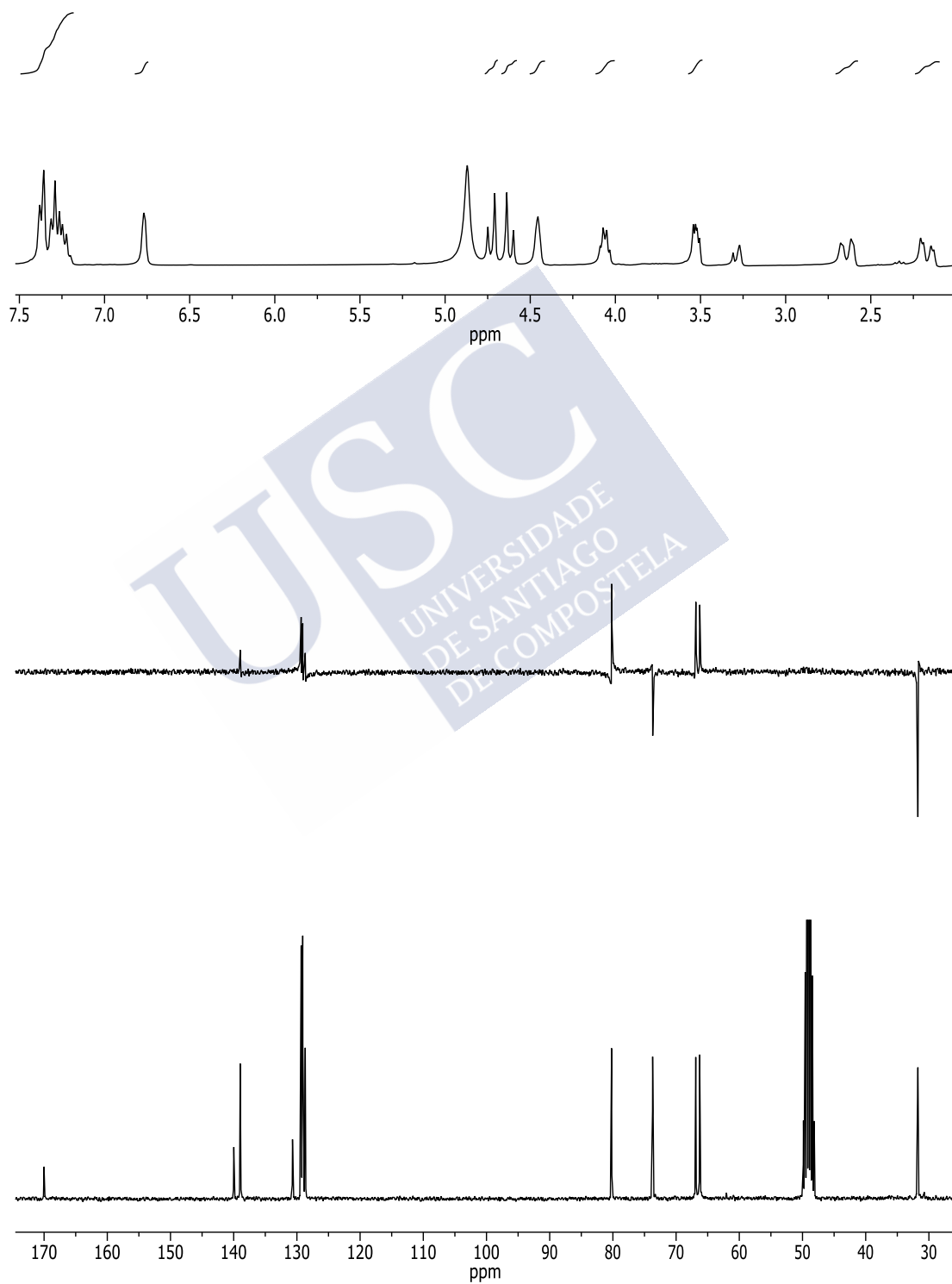
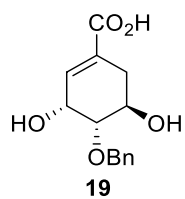


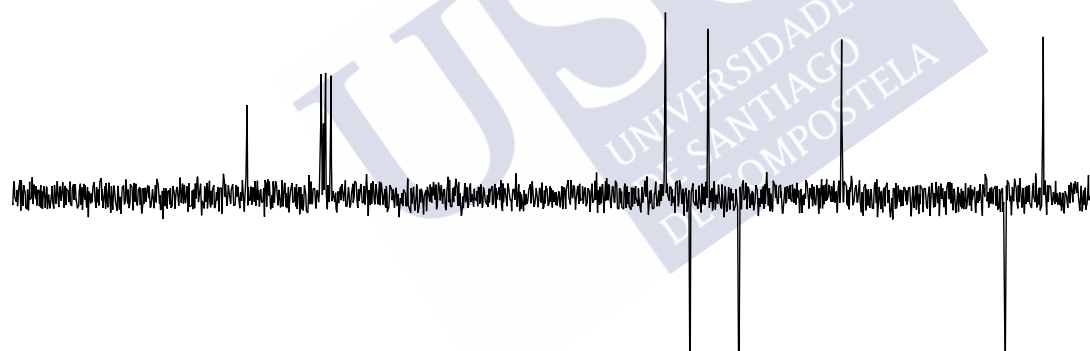
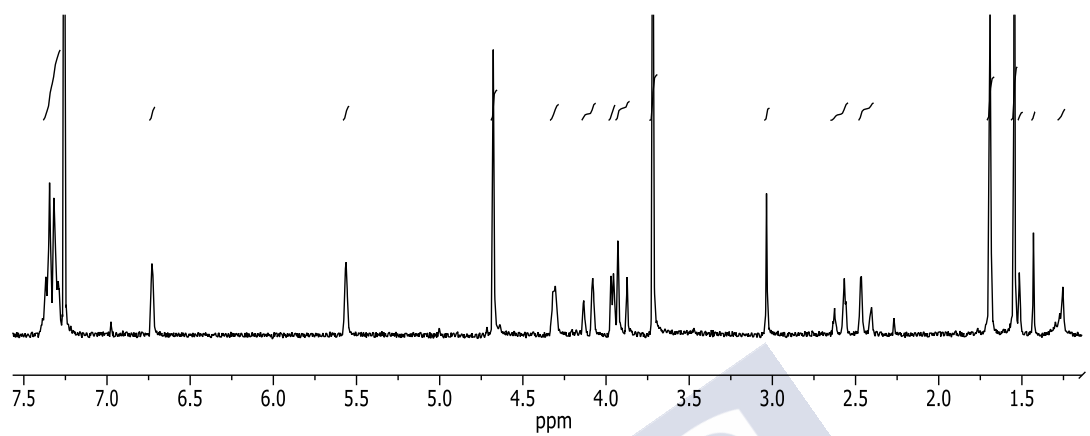
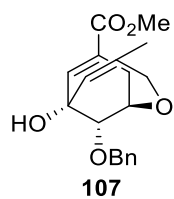


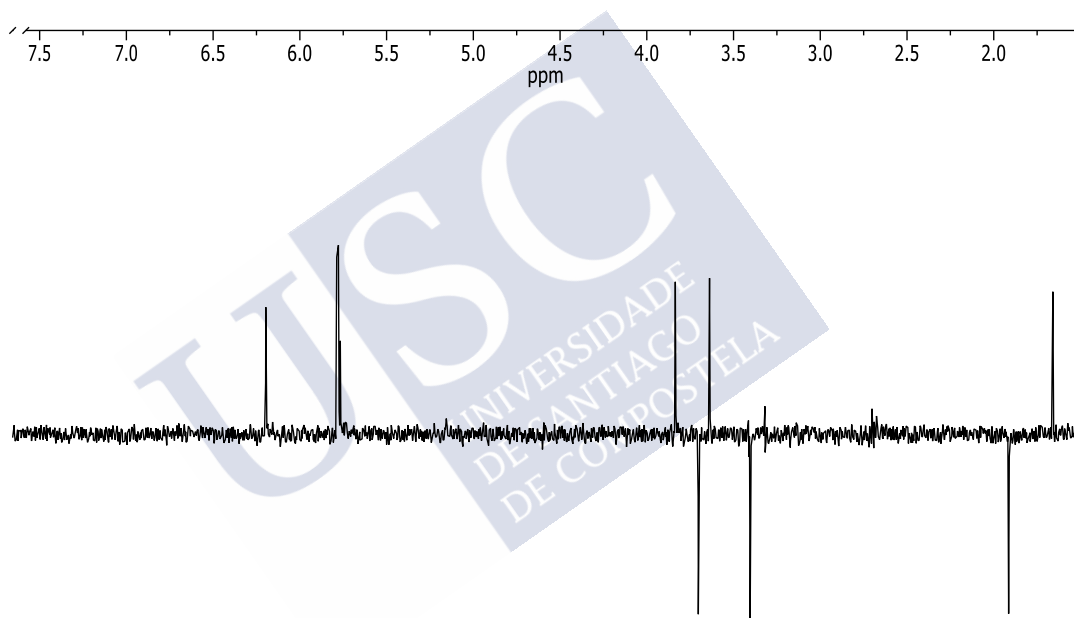
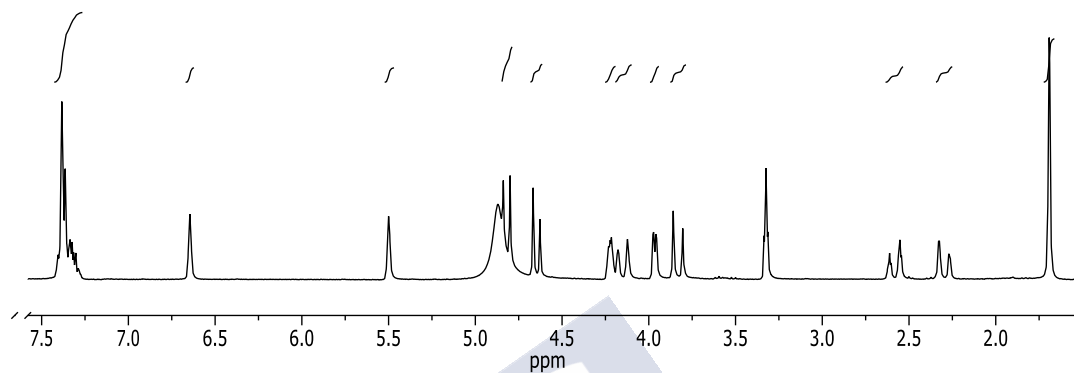
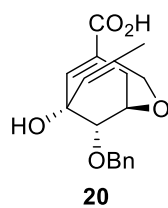








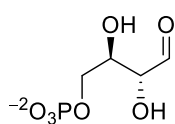




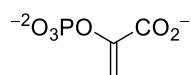




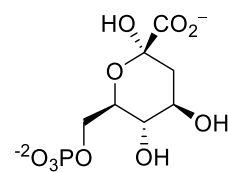




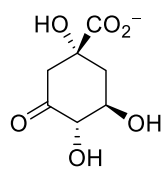
1



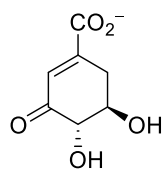
2



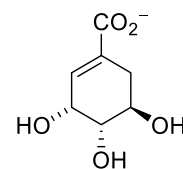
3



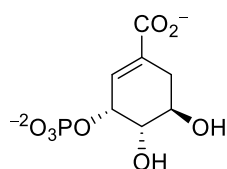
4



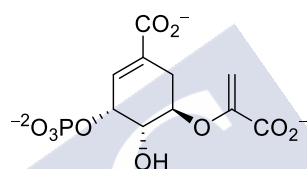
5



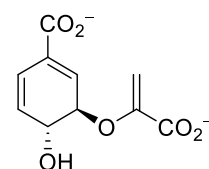
6



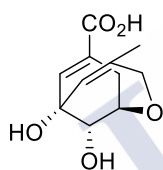
7



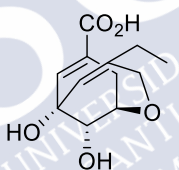
8



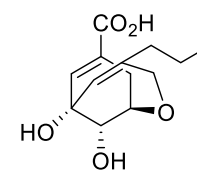
9



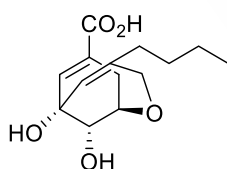
10a



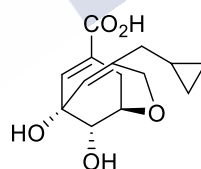
10b



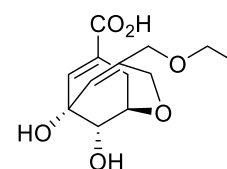
10c



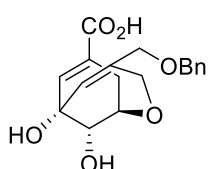
10d



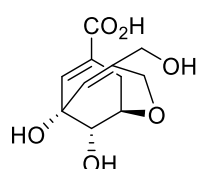
10e



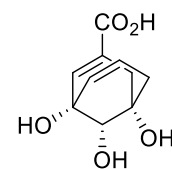
10f



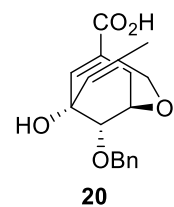
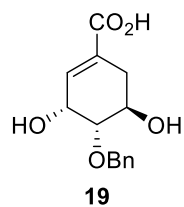
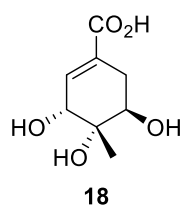
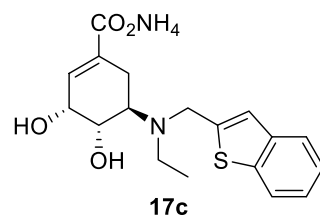
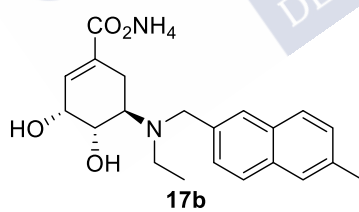
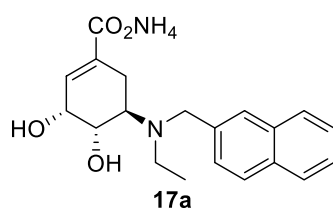
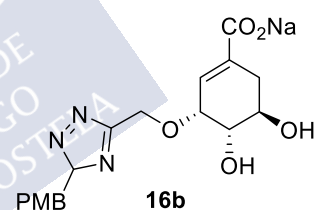
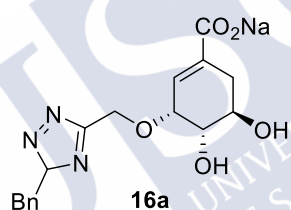
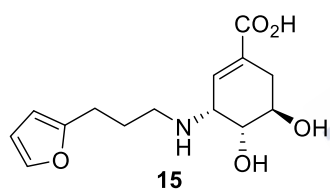
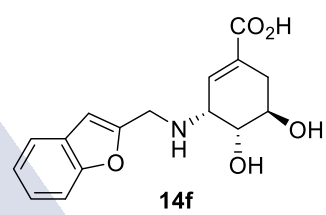
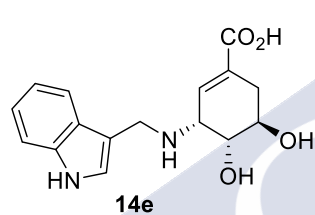
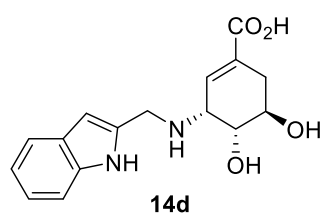
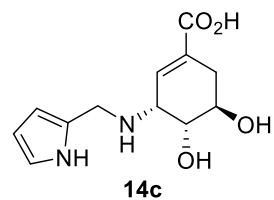
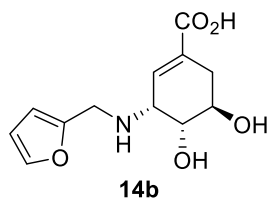
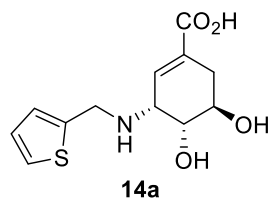
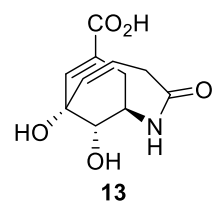
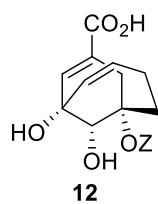
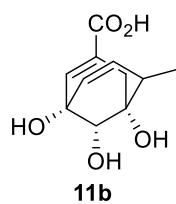
10g

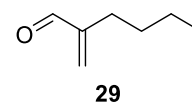
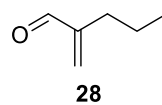
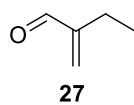
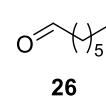
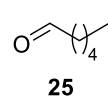
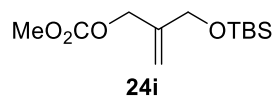
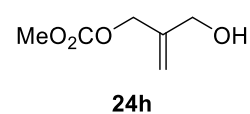
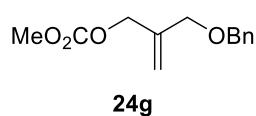
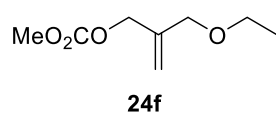
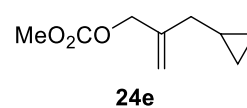
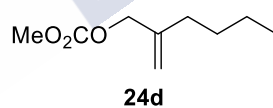
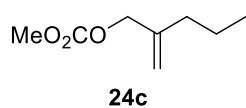
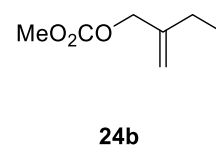
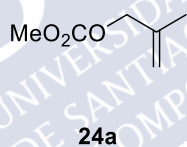
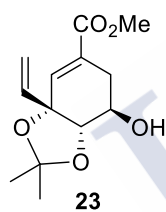
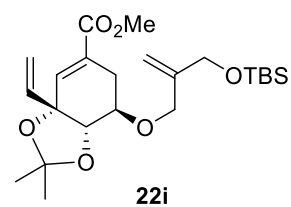
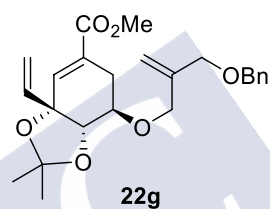
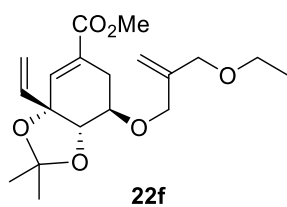
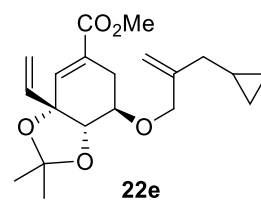
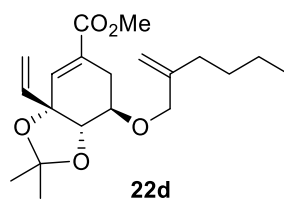
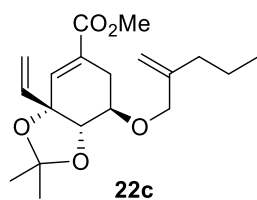
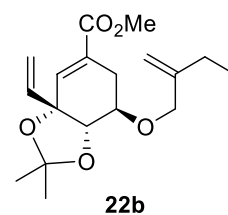
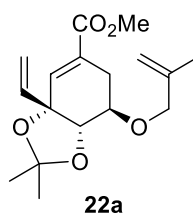
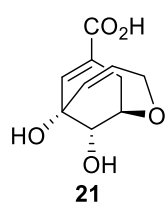


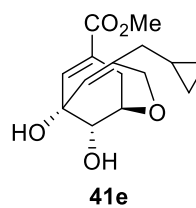
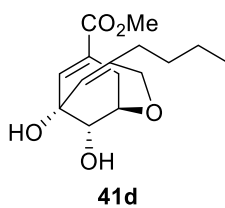
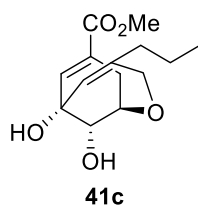
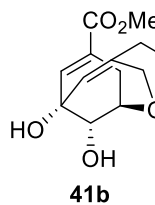
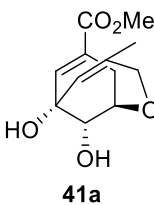
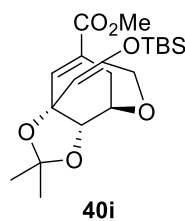
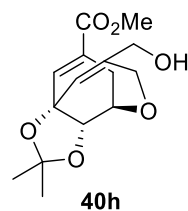
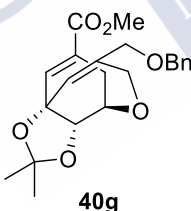
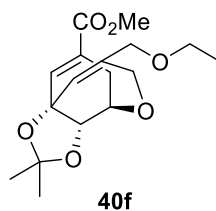
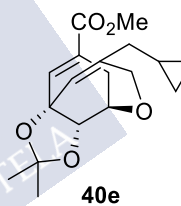
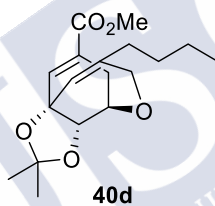
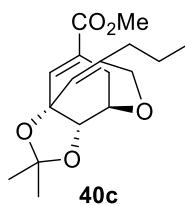
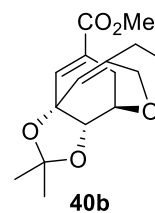
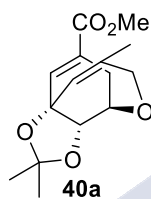
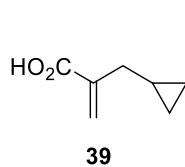
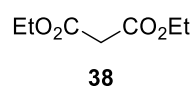
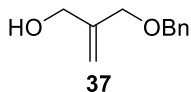
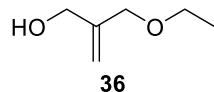
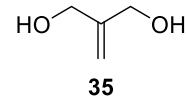
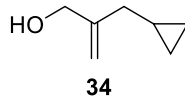
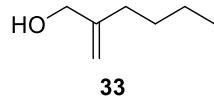
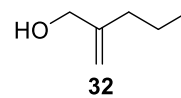
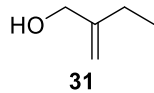
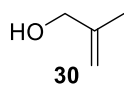
10h

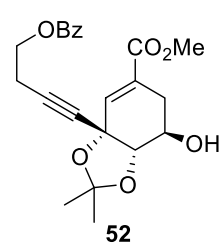
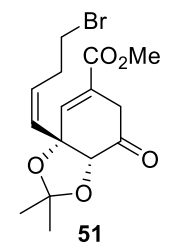
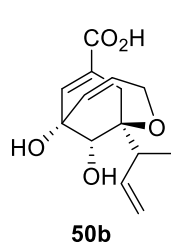
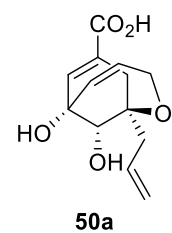
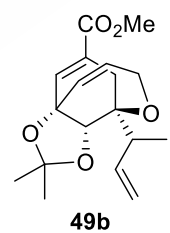
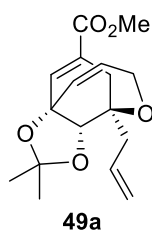
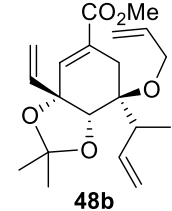
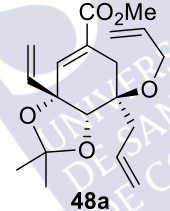
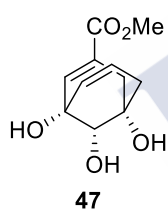
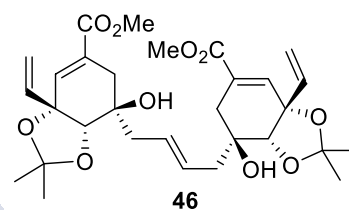
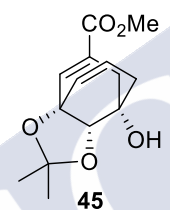
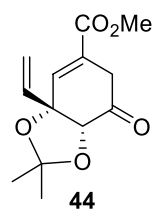
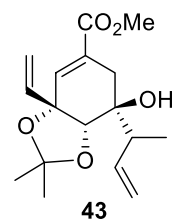
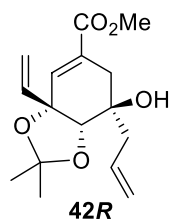
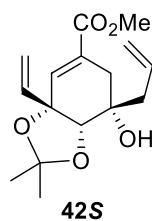
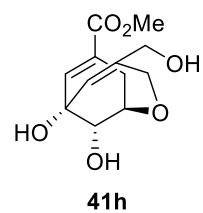
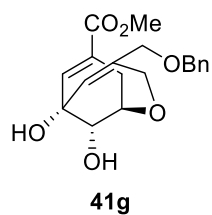
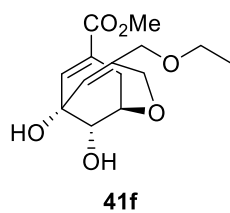


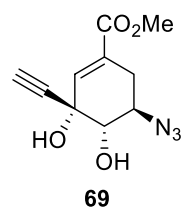
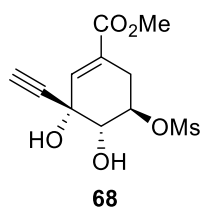
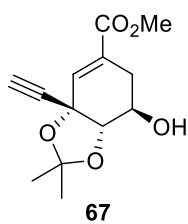
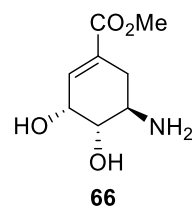
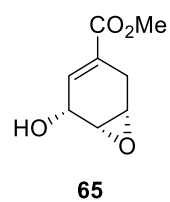
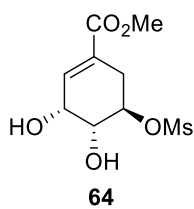
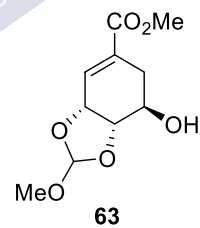
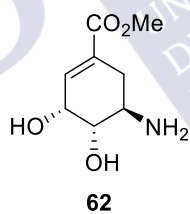
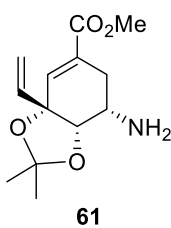
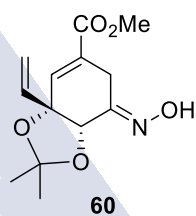
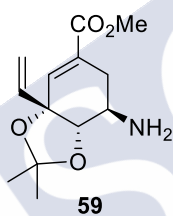
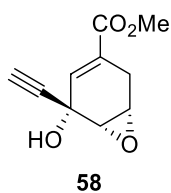
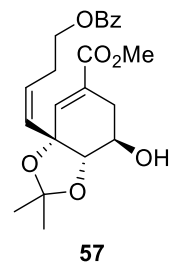
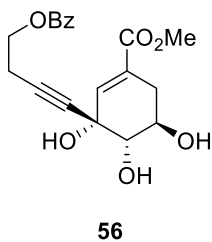
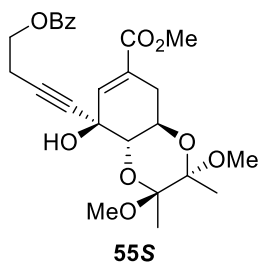
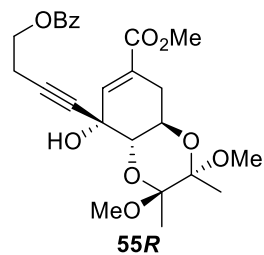
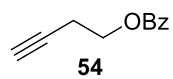
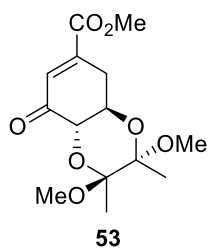
11a

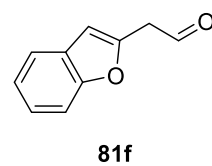
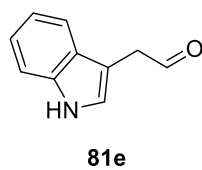
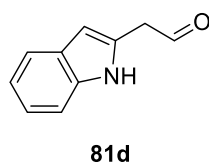
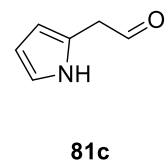
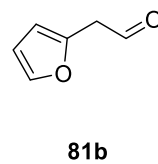
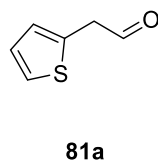
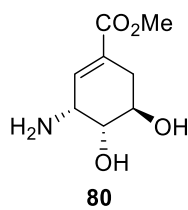
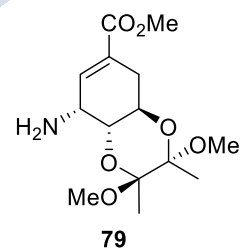
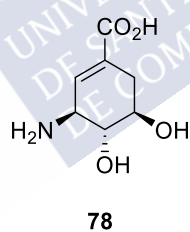
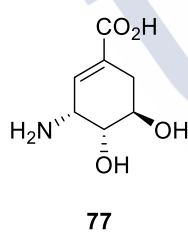
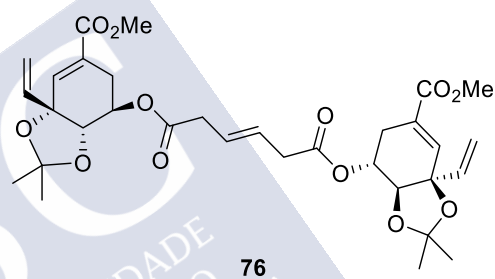
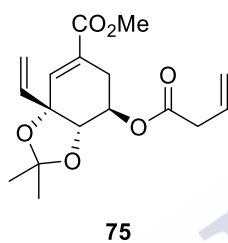
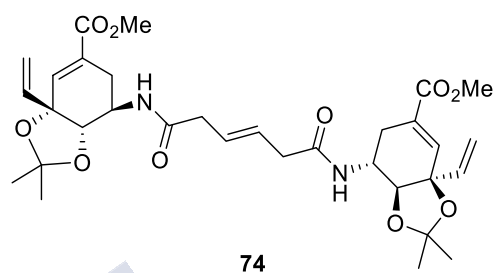
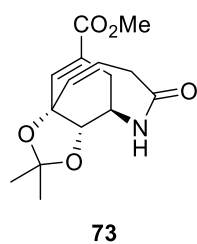
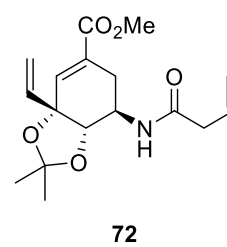
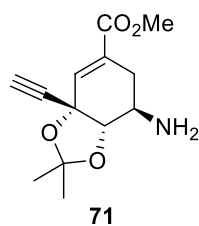
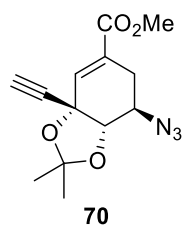


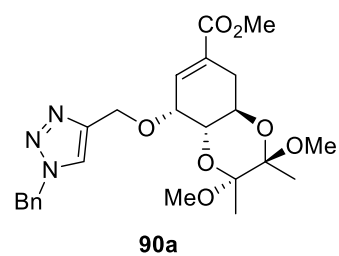
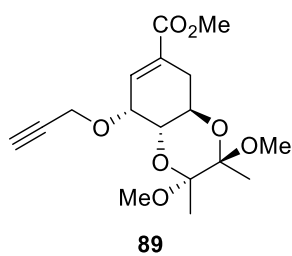
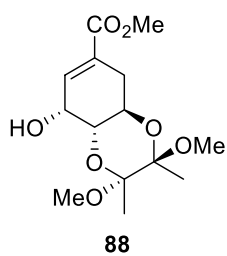
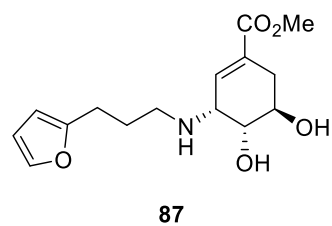
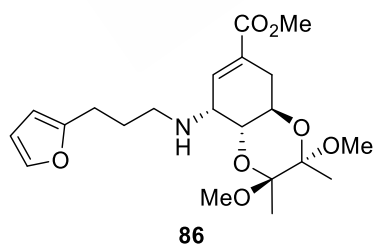
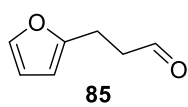
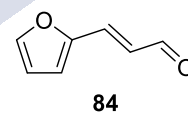
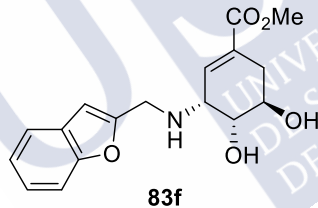
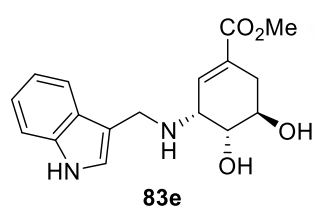
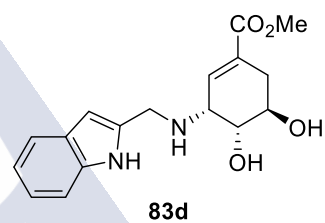
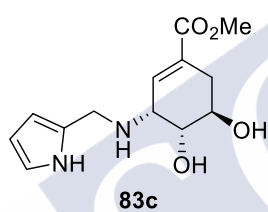
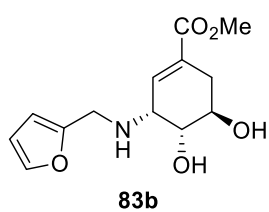
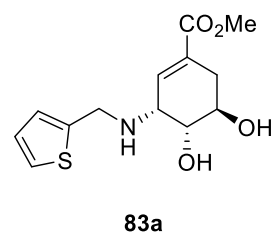
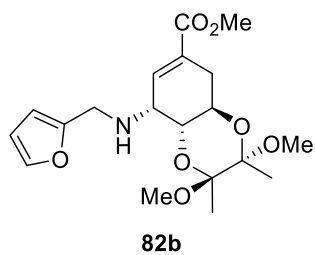
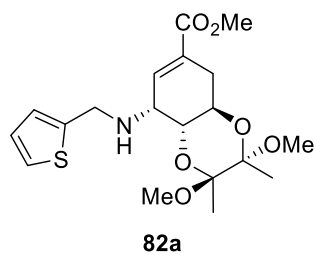
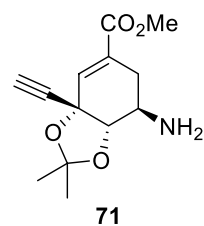
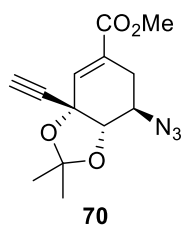
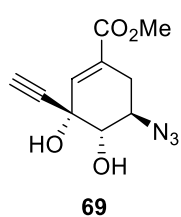


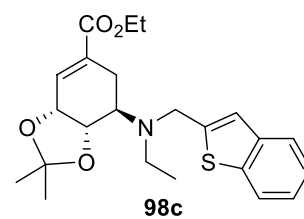
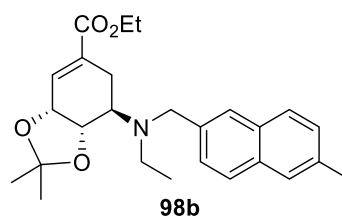
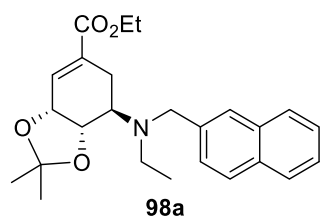
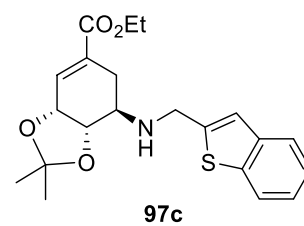
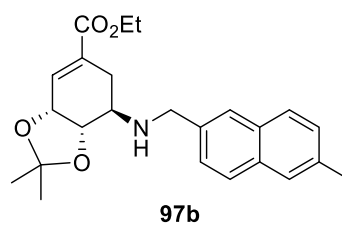
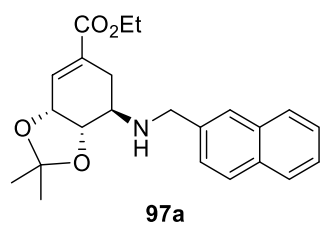
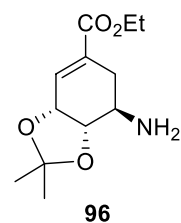
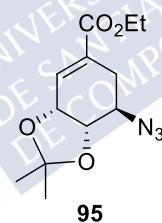
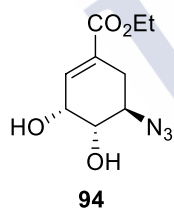
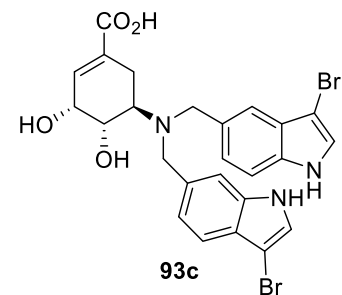
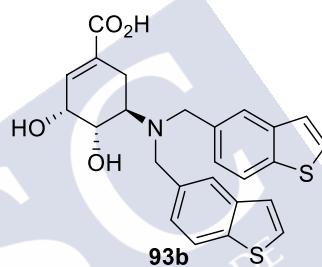
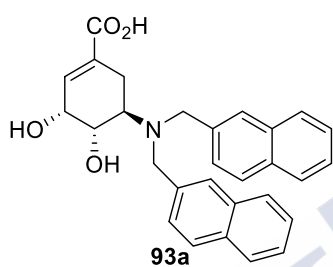
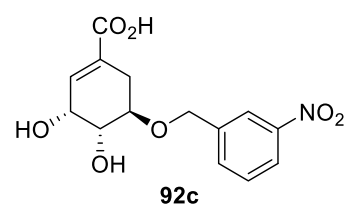
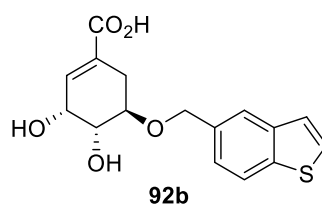
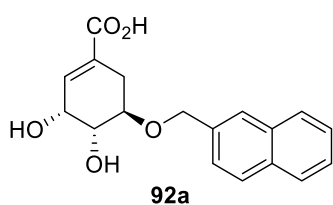
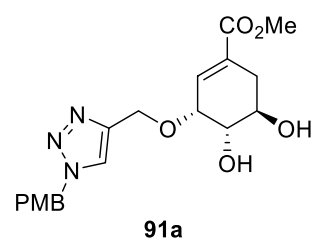
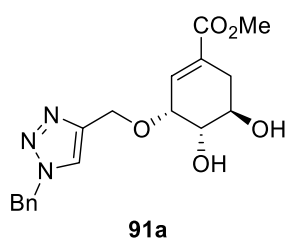
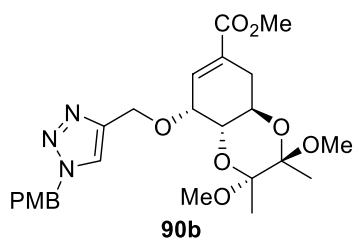


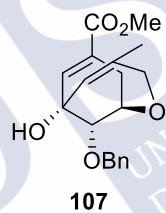
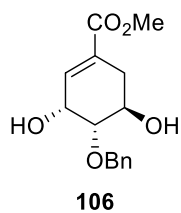
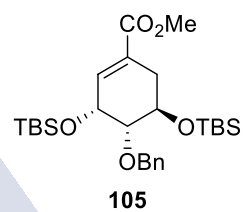
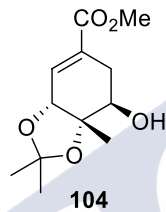
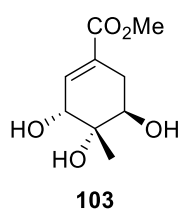
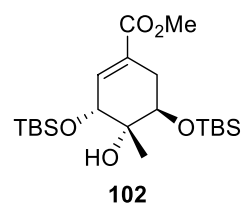
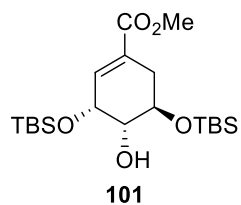
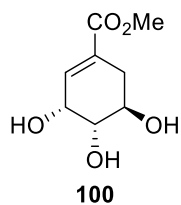
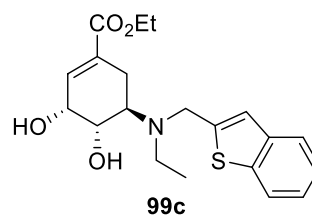
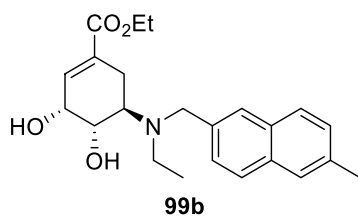
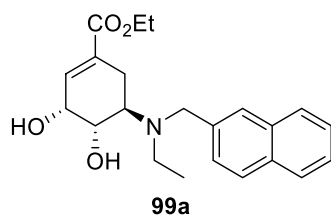














ANEXO III. Referencias



- (1) Aminov, R. I. *Front. Microbiol.* **2010**, *1*, 1–7.
- (2) Fleming, A. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226–236.
- (3) Sengupta, S.; Chattopadhyay, M. K.; Grossart, H. P. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 1–13.
- (4) Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A. K. M.; Wertheim, H. F. L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G. L.; Gould, I. M.; Goossens, H. et al. *Lancet Infect Dis.* **2013**, *13*, 1057–1098.
- (5) Palumbi, S. R. *Science.* **2001**, *293*, 1786–1790.
- (6) Coates, A.; Hu, Y.; Bax, R.; Page, C. *Nat. Rev. Drug. Discovery.* **2002**, *1*, 895–910.
- (7) D’Costa, V. M.; King, C. E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W. W. L.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels, F.; Debruyne, R.; Golding, G. B.; Poinar, H. N.; Wright, G. D. *Nature.* **2011**, *477*, 457–461.
- (8) http://www.who.int/drugresistance/Microbes_and_Antimicrobials/es/index/html
- (9) Ventola, C. L. *P & T: a peer-reviewed J. Formul. Manag.* **2015**, *40*, 277–283.
- (10) Chopra, I.; Hesse, L.; O’Neill, A. *Pharmacochemistry Library.* **2002**, *32*, 213–225.
- (11) Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. *Science.* **2009**, *325*, 1089–1093.
- (12) Lewis, K. *Nature.* **2012**, *485*, 439–440.
- (13) Moyer, M. W. *Sci. Am.* **2016**, *315*, 70–79.
- (14) González-Bello, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4221–4228.
- (15) <http://www.ecdc.europa.eu>
- (16) a) <https://amr-review.org/> b) <http://agroavances.com/sabiasque-detalle.php?idSab=115>
- (17) Chellat, M. F.; Raguz, L.; Riedl, R. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55*, 6600–6626.
- (18) WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. 2017. (https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/PPLreport_2017_09_19.pdf)
- (19) WHO. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe. 2019. (https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/tuberculosis-surveillance-monitoring-Europe-2019-20_Mar_2019.pdf)
- (20) Pai, M.; Behr, M. A.; Dowdy, D.; Dheda, K.; Divangahi, M.; Boehme, C. C.; Ginsberg, A.; Swaminathan, S.; Spigelman, M.; Getahun, H.; Menzies, D.; Raviglione, M. *Nature reviews. Disease primers.* **2016**, *2*, 1–23.
- (21) Dover, L. G.; Coxon, G. D. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6157–6165.
- (22) Gutiérrez-Lugo, M. T.; Bewley, A. C. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2606–2612.
- (23) Kim, D. H. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2008**, *178*, 1075–1082.
- (24) The First New Tuberculosis Drug in Decades: Promise and Challenges. www.treatmentactiongroup.org/tagline/2011/winter/new-tb-drug_decades.

- (25) <http://www.newtbdrugs.org/pipeline.php>
- (26) Bang-Le, Z.; Cheng-Qi, F.; Lei, D.; Fang-Dao, W. Y.; Jian-Min, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5285–5264.
- (27) Organización Mundial de Gastroenterología, *Helicobacter pylori* en los países en desarrollo, 2010.
(<http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/helicobacter-pylori-spanish-2010.pdf>)
- (28) Tepes, B.; O'Connor, A.; Gisbert, J. P.; O'Morain, C. *Helicobacter*. **2012**, *17*, 36–42.
- (29) Sjostrom, J. E.; Larsson, H. *J. Med. Microbiol.* **1996**, *44*, 425–433.
- (30) Grahan, D. Y.; Shiotani, A. *Nat. Clin. Prac. Gastroenterol. Hepatol.* **2008**, *5*, 321–331.
- (31) Mégraud, F. *Gut*. **2004**, *53*, 1374–1384.
- (32) O'Connor, A.; Gisbert, J. P.; McNamara, D.; O'Morain, C. *Helicobacter*. **2010**, *15*, 46–52.
- (33) Wu, W.; Yang, Y.; Sun, G. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2012**, *2012*, 1–8.
- (34) Thaker, Y.; Moon, A.; Afzali, A. *J. Clin. Gastroenterol. Treat.* **2016**, *2*, 1–5.
- (35) Walsh, C. *Microbiology*. **2003**, *1*, 65–70.
- (36) <http://www.essentialgene.org>
- (37) Mills, S. D. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 749–752.
- (38) Zhen, C. J.; Yap, C. W.; Ji, Z. L.; Cao, Z. W.; Chen, Y. Z. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 259–279.
- (39) <http://targetdb-dev.rutgers.edu>
- (40) Abell, C. *Enzymology and molecular biology of the shikimate pathway*. En: *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Sankawa, U., Ed. Elsevier Science Ltd.: Oxford. 1999, vol. 1, pág. 573–607.
- (41) Haslam, E. *The Shikimate Pathway: Metabolism and Metabolites*, Wiley. New York, 1974.
- (42) Herrmann, K.; Weaver, L. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **1999**, *50*, 473–755.
- (43) Gibson, F.; Pittard, J. *J. Bacteriol. Rev.* **1968**, *32*, 465–492.
- (44) Braus, G. H. *Microbiol. Rev.* **1991**, *55*, 349–370.
- (45) Roberts, F.; Roberts, C. W.; Johnson, J. J.; Kyle, D. E.; Krell, T.; Coggins, J. R.; Coombs, G. H.; Milhous, W. K.; Tzipori, S.; Ferguson, D. J. P.; Chakrabarti, D.; McLeod, R. *Nature*. **1998**, *393*, 801–805.
- (46) Parish, T.; Stoker, N. G. *Microbiology*. **2002**, *148*, 3069–3077.
- (47) González-Bello, C. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 960–977.
- (48) Bentley, R. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1990**, *25*, 307–384.
- (49) a) Salama, N. R.; Shepherd, B.; Falkow, S. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 7926–7935.
b) Sasseti, C. M.; Boyd, D. H.; Rubin, E. J. *Mol. Microb.* **2003**, *48*, 77–84. c) de Berardinis, V.; Vallenet, D.; Castelli, V.; Besnard, M.; Pinet, A.; Cruaud, C.; Samair, S.; Lechaplais, C.; Gyapay, G.; Richez, C.; Durot, M.; Kreimeyer, A.; Le Fèvre, F.; Schächter, V.; Pezo, V.; Döring, V.; Scarpelli, C.; Médigue, C.; Cohen,

- G. N.; Marlière, P.; Salanoubat, M.; Weissenbach, J. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*, 1–15.
- (50) Mduli, K.; Spigelman, M. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 459–467.
- (51) a) Steinrücken, H. C.; Amrhein, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *94*, 1207–1212. b) Franz, J. E.; Mao, M. K.; Sikorski, J. A. *Glyphosate: a unique global herbicide*. Washington, D. C.: American Chemical Society Monograph 189; American Chemical Society; 1997. c) Sikorski, J. A.; Gruys, K. *J. Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 2–8. d) Franz, J. E. *The herbicide glyphosate*. Grossbard, E. & Atkinson, D., Eds. Boston, MA: Butterworths; 1985, pág. 3–17. e) Steinrücken, H. C.; Amrhein, N. *Eur. J. Biochem.* **1984**, *143*, 351–357. f) Priestman, M. A.; Healy, M. L.; Funke, T.; Becker, A.; Schönbrunn, E. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5773–5780.
- (52) a) Schönbrunn, E.; Eschenburg, S.; Shuttleworth, W. A.; Schloss, J. V.; Amrhein, N.; Evans, J. N. S.; Kabsch, W. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 1376–1380. b) Funke, T.; Han, H.; Healy-Fried, M. L.; Fisher, E. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 13010–13015.
- (53) McConkey, G. A.; Pinney, J. W.; Westhead, D. R.; Plueckhahn, K.; Flitzpatrick, T. B.; Macheroux, P.; Kappes, B. *Trend in Parasitology.* **2004**, *20*, 60–65.
- (54) De María, N.; Becerril, J. M.; García-Plazaola, J. I.; Hernández, A.; De Felipe, M. R.; Fernández-Pascual, M. J. *Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2621–2328.
- (55) Chen, K.; Dou, J.; Tang, S.; Yang, Y.; Wang, H.; Fang, H.; Zhou, C. *Bioresour. Technol.* **2012**, *119*, 141–147.
- (56) a) Krell, T.; Coggins, J. R.; Lapthorn, A. J. *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 983–997. b) Gu, Y.; Reshetnikova, L.; Li, Y.; Wu, Y.; Yan, H.; Singh, S.; Ji, X. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 779–789.
- (57) Dhaliwal, B.; Nichols, C. E.; Ren, J.; Lockyer, M.; Charles, I.; Hawkins, A. R.; Stammers, D. K. *FEBS Lett.* **2004**, *574*, 49–54.
- (58) La numeración corresponde a la SQ procedente de *M. tuberculosis*.
- (59) Blanco, B.; Prado, V.; Lence, E.; Otero, J. M.; Garcia-Doval, C.; Van Raaij, M. J.; Llamas-Saiz, A. L.; Lamb, H.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12366–12376.
- (60) Cheng, W. C.; Chen, Y. F.; Wang, H. J.; Hsu, K. C.; Lin, S. C.; Chen, T. J.; Yang, T. J. *PLOS ONE.* **2012**, *364*, 411–423.
- (61) Walker, J. E.; Saraste, M.; Runswick, M.; Gay, N. J. *EMBO J.* **1982**, *1*, 945–951.
- (62) Hartmann, M. D.; Bourenkov, G. P.; Oberschall, A.; Strizhov, N.; Bartunik, H. D. *J. Mol. Biol.* **2006**, *364*, 411–423.
- (63) Prado, V.; Lence, E.; Vallejo, J. A.; Beceiro, A.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 2758–2768.
- (64) <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
- (65) Krell, T.; Maclean, J.; Boam, D. J.; Cooper, A.; Resmini, M.; Brocklehurst, K.; Kelly, S. M.; Price, N. C.; Lapthorn, A. J.; Coggins, J. R. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1137–1149.

- (66) Mehra, R.; Rajput, V.-S.; Gupta, M.; Chib, R.; Kumar, A.; Wazir, P.; Ali Khan, I.; Nargotra, A. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 930–940.
- (67) Rajput, V. S.; Mehra, R.; Kumar, S.; Nargotra, A.; Singh, P. P.; Khan, I. A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 5415–5426.
- (68) Simithy, J.; Reeve, N.; Hobrath, J. V.; Reynolds, R. C.; Calderón, A. I. *Tuberculosis.* **2014**, *94*, 152–158.
- (69) Peng, J.; Kudrimoti, S.; Prasanna, S.; Odde, S.; Doerksen, R. J.; Pennaka, H. K.; Choo, Y.-M.; Rao, K. V.; Madgula, V.; Khan, S. I.; Wang, B.; Mayer, A. M. S.; Jacob, M. R.; Hamann, M. T. *J. Med Chem.* **2010**, *53*, 61–76.
- (70) Rao, K. V.; Donia, M. S.; Peng, J.; Garcia-Palomero, E.; Alonso, D.; Martinez, A.; Medina, M.; Franzblau, S. G.; Tekwani, B. L.; Khan, S. I. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1034–1040.
- (71) Waters, A. L.; Hill, R. T.; Place, A. R.; Hamann, M. T. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 780–786.
- (72) Wahba, A. E.; Peng, J.; Kudrimoti, S.; Tekwani, B. L.; Hamann, M. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7775–7782.
- (73) Simithy, J.; Fuanta, N. R.; Alturki, M.; Hobrath, J. V.; Wahba, A. E.; Pina, I.; Rath, J.; Hamann, M. T.; DeRuiter, J.; Goodwin, D. C.; Calderón, A. I. *Biochemistry.* **2018**, *57*, 4923–4933.
- (74) Luibrand, R. T.; Erdman, T. R.; Vollmer, J. J.; Scheuer, P. J.; Finer, J.; Clardy, J. *Tetrahedron.* **1979**, *35*, 609–612.
- (75) Simithy, J.; Fuanta, N. R.; Kochanowska-Karamyan, A.; Hobrath, J. V.; Hamann, M. T.; Goodwin, D. C.; Calderón, A. I. *BBA - Proteins and Proteomics.* **2018**, *5*, 731–739.
- (76) Omura, S.; Iwai, Y.; Hirano, A.; Nakagawa, A.; Awaya, J.; Tsuchiya, H.; Takahashi, Y.; Masuma, R. *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 275–282.
- (77) Tanramluk, D.; Schreyer, A.; Pitt, W. R.; Blundell, T. L. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2009**, *74*, 16–24.
- (78) Mulabagal, V.; Calderón, A. *Anal Chem.* **2010**, *82*, 3616–3621.
- (79) Gordon, S.; Simithy, J.; Douglas, C. S.; Calderón, A. I. *Perspectives in Medicinal Chemistry.* **2015**, *7*, 9–20.
- (80) Bandodkar, B. S.; Schmitt, S. *Pyrazolone derivatives for the treatment of tuberculosis.* Patent, WO/2007/020426 A1, 2007.
- (81) Abunada, N.; Hassaneen, H.; Kandile, N.; Miqdad, O. *Molecules.* **2008**, *13*, 1011–1024.
- (82) Castagnolo, D.; Manetti, F.; Radi, M.; Bechi, B.; Pagano, M.; De Logu, A. Meleddu, R.; Saddi, M.; Botta, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5716–5721.
- (83) Bandodkar, B. S.; Schmitt, S. *Pyrazoline derivatives for the treatment of tuberculosis.* US Patent App. 12/063,740, 2010.
- (84) Berg, J.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry* (6th Edition). W.H Freeman and Company. New York. **2006**.
- (85) Prado, V.; Lence, E.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 17988–18000.

- (86) Prado, V.; Lence, E.; Maneiro, M.; Vázquez-Ucha, J. C.; Beceiro, A.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5471–5487.
- (87) Sitzmann, M.; Weidlich, I. E.; Filippov, I. V.; Liao, C.; Peach, M. L.; Ihlenfeldt, W.-D.; Karki, R. G.; Borodina, Y. V.; Cachau, R. E.; Nicklaus, M. C. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 739–756.
- (88) Chang, C. E.; Chen, W.; Gilson, M. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 1534–1539.
- (89) Hao, M. H.; Haq, O.; Muegge, I. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 2242–2252.
- (90) Fang, Z.; Song, Y.; Zhan, P.; Zhang, Q.; Liu, X. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 885–901.
- (91) Bolognesi, M.L.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Andrisano, V.; Rosini, M.; Minarini, A.; Melchiorre, C. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5945–5952.
- (92) Barber, C. G.; Blakemore, D. C.; Chiva, J. Y.; Eastwood, R. L.; Middleton, D. S.; Paradowski, K. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1499–1503.
- (93) Wang, W.; Wang, S.; Liu, Y.; Dong, G.; Cao, Y.; Miao, Z.; Yao, J.; Zhang, W.; Sheng, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 6020–6026.
- (94) Mohanrao, R.; Asokan, A.; Sureshan, K. M. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 6707–6710.
- (95) Alves, C.; Barros, M. T.; Maycock, C. D.; Ventura, M. R. *Tetrahedron.* **1999**, *55*, 8443–8456.
- (96) Tiecco, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *16*, 3447–3458.
- (97) a) Fersht, A. *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*, 2° Ed., Freeman, W. H., New York, 1999, pág. 103–114. b) Bugg, T. *An introduction to enzyme and coenzyme chemistry*, Blackwell Science, Oxford, 1997, pág 44–53.
- (98) Pernas, M.; Blanco, B.; Lence, E.; Thompson, P.; Hawkins, A.; González-Bello, C. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 2514–2528.
- (99) Resultados sin publicar.
- (100) Naud, S.; Macnaughton, S. J.; Dyson, B. B. S.; Woollaston, D. J.; Dallimoreb, J. W. P.; Robertson, J. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3506–3518.
- (101) Zhang, Y.; Liu, A.; Ye, Z. G.; Lin, J.; Xu, L. Z.; Yang, S. L. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 1459–1461.
- (102) Gonzalez-Bello, C.; Coggins, J. R.; Hawkins, A. R.; Abell, C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1999**, *8*, 849–854.
- (103) Dai, Y.; Wu, F.; Zang, Z.; You, H.; Gong, H. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 808–812.





ANEXO IV. Publicaciones



Publicaciones derivadas de la realización de esta tesis doctoral:

Título: Synthesis of Rigidified Shikimic Acid Derivatives by Ring-Closing Metathesis to Imprint Inhibitor Efficacy against Shikimate Kinase Enzyme

Autores: Pernas, M.; Blanco, B.; Lence, E.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; González-Bello, C.

Revista: Organic Chemistry Frontiers.

Año: 2019 **Volumen:** 6 **Pág.:** 2514–2528.

DOI: 10.1039/c9qo00562e

Enlace:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/qo/c9qo00562e#!divAbstract>

